Ursula Vehling

DNS - STOFFWECHSELAKTIVITÄT IM MENSCHLICHEN KNOCHENMARK UND BLUT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER UNTERSUCHTEN ZELLPOPULATION

Diss. München
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544308_0018

Aus der III.Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof.W.Wilmanns

DNS - STOFFWECHSELAKTIVITÄT IM MENSCHLICHEN KNOCHENMARK UND BLUT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER UNTERSUCHTEN ZELLPOPULATION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

vorgelegt von

Ursula Vehling

.....

aus

Datteln

.....

Jahr

1983

.....

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Wilmanns
Mitberichterstatter:	
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	24. 11. 1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Abstract

Vehling, Ursula:

DNS-Stoffwechselaktivität Im Menschlichen Knochenmark und Blut In Abhängigkeit Von Der Untersuchten Zellpopulation

Zellmorphologie und DNS-Stoffwechselaktivität wurden in verschieden bearbeiteten Zellsuspensionen von Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PBL) untersucht:

1. isolierte kernhaltige Zellen nach Abtrennung des Erythrocytenanteils (Methode I)
2. defibriniertes Knochenmark oder Blut ohne weitere Zellisolierung (Methode II)

Bei Anwendung der Methode I treten wegen der aggressiveren Aufbereitung (Ammoniumchlorid) beim KM und PBL wesentlich größere Zellschäden auf, als bei Methode I. Damit ist Methode II für die Berechnung der Einbauaktivitäten ^{3}H-dTR bzw. ^{3}H-dUR in die Zellen besser geeignet. Zur Berechnung der Einbauaktivitäten sollten nur die Zellen mit DNS-Stoffwechsel (proliferierender Teil) herangezogen werden. Die Zellpopulationen müssen in Abhängigkeit vom Krankheitsbild beurteilt werden (akut leukämische, nicht akut leukämische Erkrankungen). Bei den akut leukämischen Erkrankungen kann Methode I benutzt werden, da die Zellpopulationen hauptsächlich aus Blasten bestehen und eine Zerstörung keinen großen Einfluß auf die morphologische Zusammensetzung hat. Bei den nicht akut leukämischen Zellpopulationen ist zur Berechnung eine genaue Differenzierung notwendig. Die Zellen der Erythropoese werden durch Methode I nahezu vollständig zerstört, was sich entscheidend auf den Anteil proliferierender Zellen und damit auf die Höhe der Einbauaktivität auswirkt. Somit kommt zur Aufbereitung nicht akut leukämischer Zellpopulationen nur Methode II in Frage. Zur Verlaufskontrolle von Erkrankungen sollte Methode II Verwendung finden, da hier die Zellinkubation unter autologen Bedingungen erfolgt. Anhand der Einbauaktivitäten und des Quotienten dUR/dTR kann man die Ergebnisse der Methotrexat - Behandlung bei Patienten mit akut lymphatischer Leukämie verfolgen.

Dem Andenken meiner Mutter

Ilse Vehling

gewidmet

Herrn Oberarzt Privat-Dozent Dr.H.Sauer
möchte ich für die Überlassung des Themas
und die Anleitung bei der Differenzierung
der Zellausstriche danken.

Frau Dr.Gabler, Pathologisches Institut
Harlaching, danke ich für die Anfertigung
der Photographien der Zellausstriche.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Abkürzungsverzeichnis	1
II.	Einleitung	3
III.	Methodik	9
1.	Blut- und Knochenmarkentnahme	9
1.1	Blut für die Zellisolierung	9
1.2	Knochenmark für die Zellisolierung	9
1.3	Blut für die defibrinierte Zellsuspension	10
1.4	Knochenmark für die defibrinierte Zellsuspension	10
2.	Zellisolierung und Zellzählung	12
2.1	Isolierung kernhaltiger Zellen aus dem peripheren Blut	12
2.2	Isolierung kernhaltiger Zellen aus dem Knochenmark	12
2.3	Zellzählung	13
3.	Färbung	14
4.	Einbau von DNS-Vorstufen in die DNS von Blut-und Knochenmarkszellen	17
4.1	Isolierte, kernhaltige Zellen (Methode I)	17
4.1.1	Testansätze	17
4.1.2	Berechnung der Einbauraten	20
4.2	Nicht isolierte, defibrinierte Zellsuspensionen (Methode II)	21

		Seite
4.2.1	Testansätze	21
4.2.2	Berechnung der Einbauraten	22
5.	Patienten	23
IV.	Ergebnisse	25
1.	Zelldifferenzierung	25
1.1	Morphologische Einteilung der Zellen	25
1.2	Zählergebnisse	25
1.3	Probleme der Zelldifferenzierung	31
1.3.1	Anfertigung der Zellausstriche	31
1.3.2	Anzahl und Zerstörungsgrad der Zellen	31
1.3.3	Unterschied: Methode I - Methode II	33
2.	Vergleich der Ergebnisse der Beziehung der DNS-Stoffwechselaktivität	36
2.1	Mathematische Umformungen	36
2.2	Ergebnisse der Methode I und II	37
2.2.1	Untersuchung auf einen mathematischen Zusammenhang	37
2.2.2	Prozentuale Verteilung der Stoffwechselaktivitäten	41
2.2.3	Verteilung der Einbauaktivitäten von dTR und dUR und die statistische Berechnung ihrer Stoffwechselaktivitäten	49
2.3	Sonderfälle	55
2.3.1	Patienten	55
2.3.2	Meßergebnisse der Stoffwechselaktivitäten von dTR und dUR nach Korrektur der Extremwerte der Sonderfälle	58
3.1	DNS-Stoffwechselaktivitätsbestimmungen bei Patienten mit perniciöser Anämie	65
3.1	Patienten	65

		Seite
3.2	Ergebnisse der Zellzählung	65
3.3	Ergebnisse der Stoffwechselaktivitäts-bestimmung	67
4.	DNS-Stoffwechselaktivitätsbestimmung während Methotrexatbehandlung bei Patienten mit akuter Leukämie	70
4.1	Patienten	70
4.2	Ergebnisse der DNS-Stoffwechsel-aktivitätsbestimmung	70
V.	Diskussion	75
VI.	Zusammenfassung	82
VII.	Anhang : Tabellen (Tab.$_A$)	84
VIII.	Literaturverzeichnis	100
IX.	Lebenslauf	104

I. Abkürzungsverzeichnis

A	:	Adenin
ALL	:	akute lymphatische Leukämie
AML	:	akute myeloische Leukämie
C	:	Cytosin
CML	:	chronisch myeloische Leukämie
cpm	:	counts per minute
$\triangle$ cpm	:	Zählrate des Hauptwertes - Zählrate des Leerwertes
cpm_{STD}	:	Zählrate des Standards
cpm_{1h}	:	Zählrate nach 1 Stunde Inkubationsdauer
cpm_{2h}	:	Zählrate nach 2 Stunden Inkubationsdauer
dTMP	:	Thymidinmonophosphat
dTR	:	Deoxithymidin
dTTP	:	Thymidintriphosphat
dUMP	:	Deoxiuridinmonophosphat
dUR	:	Deoxiuridin
DNS	:	Deoxiribonukleinsäure
E	:	Einheit = nMol/h x 10^{10} Zellen
FH_2	:	Dihydrofolsäure
FH_4	:	Tetrahydrofolsäure
G	:	Guanin
h	:	Stunde
KM	:	Knochenmark
MG	:	Molekulargewicht
MTX	:	Methotrexat® = Amethopterin
PBL	:	peripheres Blut
RNS	:	Ribonukleinsäure
RPG	:	Ringer - Phosphat -Glukose - Lösung

s	:	Standardabweichung
STD	:	Standard
T	:	Thymidin
Tab_A	:	Tabelle im Anhang
U	:	Uridin
v	:	Varianz
$\bar{x}$	:	Mittelwert

II.Einleitung

Die Nukleinsäuren dienen der Speicherung und Übertragung genetischen Materials. Die Deoxiribonukleinsäure (DNS) wurde 1869 von dem Schweizer Johann Friedrich Miescher (1844 - 1895) erstmals isoliert. Für seine Versuche im HOPPE-SEYLERSs-Laboratorium in Tübingen benutzte Miescher Eiterzellen und Lachssperma. Da er die neue Substanz in den Zellkernen entdeckte, nannte Miescher sie "Nuclein" (4,7). Man findet die Nukleinsäuren aber nicht nur im Kern, sondern auch in anderen Zellstrukturen. Die DNS und RNS (Ribonukleinsäure) stellen Makromoleküle dar, deren monomere Einheiten Nukleotide genannt werden. Jedes Mononukleotid besteht wiederum aus je einem Molekülteil Phosphorsäure, Pentose und stickstoffhaltige heterocyclische Base. Als Basen treten bei DNS die Purin-Derivate Adenin und Guanin, sowie die Pyrimidin-Derivate Cytosin und Thymin auf. In der RNS findet sich an der Stelle von Thymin Uracil (2,6,7).

Die drei Bausteine der Nukleinsäuren sind wie folgt verknüpft:

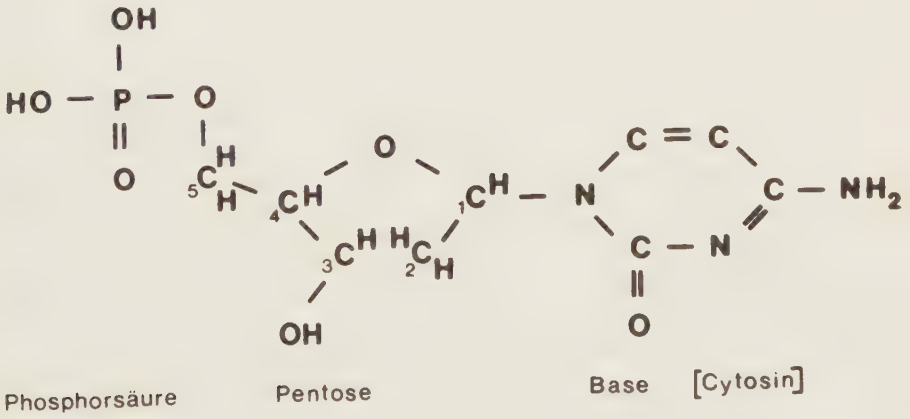


Abb. 1
Bausteine der Nukleinsäuren

1953 ergaben die Untersuchungen von Watson und Crick die räumliche Struktur der DNS. Danach sind zwei rechtsläufige schraubenförmige Polypeptidketten - antiparallel verlaufend und über 3', 5' - Phosphordiesterbrücken verbunden - zu einer Doppelhelix um eine gemeinsame Achse aufgewunden (2,6,7). Innerhalb der Helix liegen sich bestimmte Basenpaare, die durch Wasserstoffbrücken verbunden werden, gegenüber. Dabei sind aus Platzgründen innerhalb der Helix nur die Kombinationen Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin möglich (2,6,7).

Das Watson-Crick-Modell beinhaltet auch den Vorgang der sogenannten semikonservativen Replikation, die 1957 von M.S.Meselson und F.W.Stahl endgültig an der DNS von lebenden intakten Escherichia Coli-Zellen nachgewiesen wurde (7). Bei der Replikation werden die beiden Stränge der DNS durch Enzyme getrennt und je durch einen neu entstehenden Komplementstrang ergänzt. Auf diese Art und Weise erhält jedes Tochtermolekül einen elterlichen Strang (6,7).

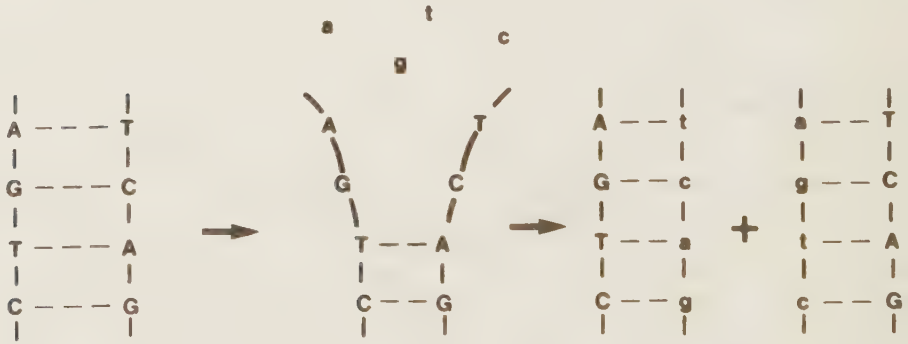


Abb.2
Semikonservative Replikation der DNS.

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse ist es möglich geworden die Replikationsrate der DNS zu ermitteln. Dazu wird z.B. eine radioaktiv markierte Base einer sich replizierenden DNS angeboten. Nach beliebiger Zeit läßt sich dann aus dem radioaktiven Meßwert und der benötigten Zeit die Einbaurate und damit die Replikationsrate der DNS bestimmen (7). Die Verdoppelung einer Zelle beinhaltet den Mitosecyclus und die Interphase, welche sich wiederum aus der G_1-Phase (Ruhestadium), der S-Phase (DNS-Synthesephase)und der G_2-Phase (postsynthetische Ruhephase) zusammensetzt (8). Die DNS-Replikation kann durch Röntgenstrahlen oder Medikamente gestört bzw. aufgehoben werden. Dieses trifft insbesondere dann zu, wenn die Hemmfaktoren in die S-Phase der Replikation eingreifen. Ein Beispiel ist das Zytostatikum Methotrexat.

Abbildung 3 soll den Zusammenhang der DNS-Synthese und Methotrexat verdeutlichen.

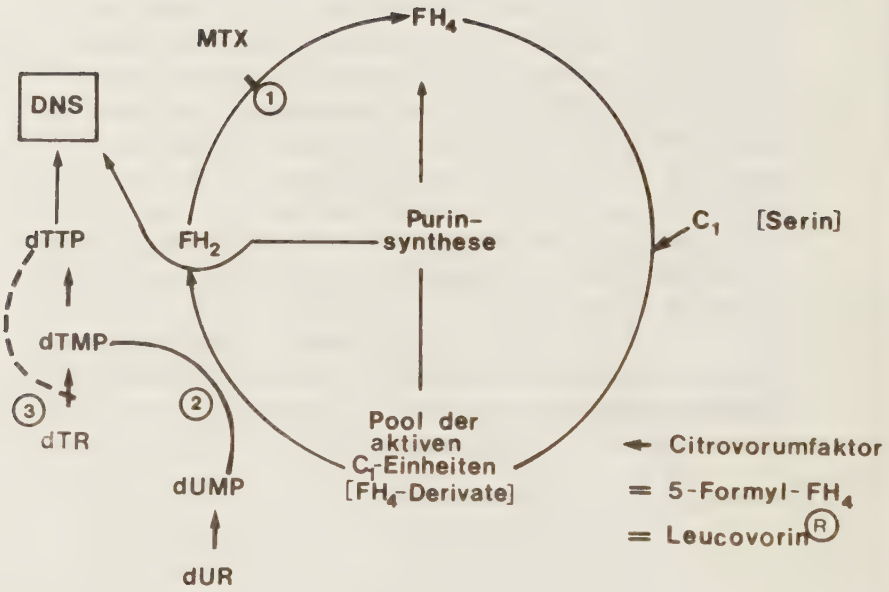


Abb.3

Biochemische MTX-Effekte (11,12)

1 Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase

2 verminderter C_1 - Pool ⟶

Substratmangel bei Thymidylatsynthese ⟶

dUR-Einbau in DNS vermindert

3 verminderte dTTP-Bildung ⟶

Zunahme der Thymidin-Kinase-Aktivität

("salvage pathway") wegen Abnahme der feedback-Hemmung --- ⟶

dTR-Einbau gesteigert

Aus Abb. 3 geht hervor, daß MTX eine verminderte Inkorporation von dUR und einen vermehrten Einbau von dTR in die DNS bewirkt. Damit ist der Quotient aus Dexoiuridin und Thymidin (^{3}H-dUR/^{3}H-dTR) ein Maß für die intrazelluläre MTX-Wirkung.

Aus dem bisher Gesagten folgt, daß als Indikator für die DNS-Stoffwechselaktivität in menschlichen Zellpopulationen die Aktivität der Inkorporation radioaktiv markierter DNS-Vorstufen in die DNS der intakten Zellen dienen kann (10 - 21). Darauf beruhend wurden in unserem Labor bei 24 Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen die Aktivitäten für die Inkorporation von ^{3}H-dTR und ^{3}H-dUR in die Zellen des Knochenmarks und in periphere weiße Blutzellen gemessen, um einen Einblick in die Proliferationsraten dieser Zellen zu gewinnen. Die Aktivitäten wurden parallel in zwei unterschiedlich präparierten Zellsuspensionen ermittelt. Die bisher übliche Methode (Methode I) erfordert eine Abtrennung der Erythrocyten von den übrigen Zellen. Dieser Vorgang ist mit einem erheblichen technischen und zeitlichen Aufwand verbunden. Im Gegensatz dazu werden bei der zweiten Methode (Methode II) die Erythrocyten in der Zellsuspension belassen.

Es stellt sich die Frage, ob die Methode I nicht durch die technisch einfachere Methode II ersetzt werden kann. Hierfür ist als erstes zu klären, ob bzw. wie sich die Zusammensetzung der Zellsuspension durch die Abtrennung der Erythrocyten verändert. Dazu ist es zunächst erforderlich, die Ergebnisse der Einbauaktivitäten zu vergleichen. Weiterhin soll untersucht werden, inwieweit der Anteil reifer, nicht proliferierender Zellen das Ergebnis der Bestimmungen der Einbauaktivitäten beeinflußt.

Daneben stellt sich die Frage, ob die nach der Methode I bzw. II behandelten Zellsuspensionen bei unterschiedlichen Erkrankungen differente Ergebnisse erbringen. Dieses Problem soll insbesondere an der Patientengruppe mit pericinöser Anämie bzw. akuter Leukämie erörtert werden.

Inwieweit die Messung der Einbauaktivitäten zur Verlaufskontrolle von der Methode der Zellaufbereitung abhängig bzw. überhaupt möglich ist, stellt einen weiteren Punkt der Untersuchung dar.

III. Methodik

1. Blut- und Knochenmarkentnahme

1.1 Blut für die Zellisolierung (Methode I)

Zur Blutentnahme werden benötigt:

5 % Mg-Titriplex-Lösung

Zusammensetzung:
5 g Mg-Titriplex (Merck 8409) ad 100 ml aqua bidest.
20 % Dextran T 500 (Pharmacia lot.Nr. 9307)
in 5 % Mg-Titriplex-Lösung; z.B. 2 g Dextran T 500 und 0,5 g Mg-Titriplex in 10 ml aqua dest. lösen
Man gibt bei Leukocyten über 10000/mm³ ca. 20 ml venöses Blut, bei Leukocyten unter 10000/mm³ ca. 40 ml Blut in silikonisierte Röhrchen, die pro 20 ml Blut 2.0 ml 5 % Mg-Titriplex enthalten. Bei niedriger, d.h. langsamer Blutsenkung, werden 9 Teile des Mg-Titriplex-Blutes zusätzlich mit 1 Teil der Mg-Titriplex-Dextran-Lösung vermischt, wodurch die Sedimentation der Erythrocyten beschleunigt wird.

1.2 Knochenmark für die Zellisolierung (Methode I)

Zur Knochenmarkentnahme werden benötigt:

5 % Mg-Titriplex (vgl. III.-1.1, S.9)

Ringer-Phosphat-Glukose-Lösung

Zusammensetzung:
Ringerlösung (1 Monat haltbar)
3.1 g NaCl (Merck 6404)
0.01 g KCl (Merck 4933)
0.05 g $MgCl_2$ (Merck 5833)
1.0 g Na HCO_3 (Merck 6329) ad 500 ml aqua bidest.
Ringer-Phosphat-Glukose-Lösung (täglich frisch mischen)
50 mg D - Glukose (Merck 8342)
22.5 ml Ringerlösung

2.5 ml 1/15 M Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7.4
(1 Monat haltbar)
80.8 ml 1/15 MK_2HPO_4 (Merck 5101) : 1.16 g ad
100 ml aqua bidest.+
19.2 ml 1/15 M KH_2PO_4 (Merck 4973) : 0.91 g ad
100 ml aqua bidest.
Auf pH 7.4 einstellen (wenn pH unter 7.4 - mit K_2HPO_4,
wenn pH über 7.4 - mit KH_2PO_4).

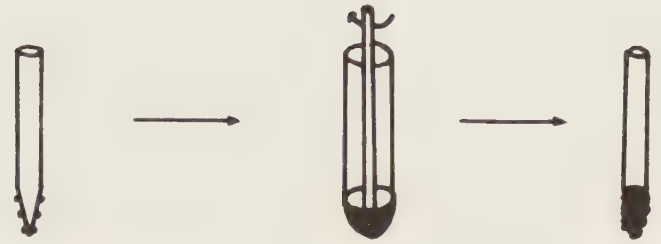
Vor der KM-Entnahme werden 1 ml RPG und 0.2 ml 5 % Mg-Titriplex in Kunststoffröhrchen gegeben und eisgekühlt mit auf die Station genommen. Nach der Entnahme spritzt man 1 - 2 ml KM in das Röhrchen und mischt anschließend.

1.3 Blut für die defibrinierte Zellsuspension (Methode II)

Die Aufbereitung des Blutes erfolgt wie die des KM
(vgl. III.-1.4, S.10)

1.4 Knochenmark für die defibrinierte Zellsuspension (Methode II)

Es werden ca. 3 - 5 ml Knochenmarkssuspension ohne irgendwelche Zusätze sofort nach der Entnahme in ein sterilisiertes Polyäthylenröhrchen gegeben (Fa.Greiner, Nürtingen, Nr. 2175). Am besten eignen sich dazu die Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 5 ml Volumen. Gewinnt man mehr KM als 3 - 5 ml, wird dieses gleichmäßig auf zwei solcher Röhrchen verteilt. Anschließend wird sofort ca. 5 Minuten lang mit einem Glasstab defibriniert. Bewährt haben sich dabei an der Spitze zugeschmolzene Pasteur-Pipetten, an die mit einer weiteren Pasteuer-Pipette einige Noppen angeschmolzen wurden. Vor Gebrauch wird diese Pipette einige Male durch die Gasflamme gezogen und damit steril gemacht.



Zugeschmolzene Pasteur-Pipette mit Noppen

Röhrchen mit KM

Pasteur-Pipette mit Fibrinpfropf

Abb.4
Vorgehen bei der Defibrinierung

Die Pasteur-Pipette wird vorsichtig und immer in derselben Richtung in der Knochenmarkssuspension gedreht. Nach ca. 5 Minuten hat sich an der Pasteur-Pipette ein Fibrinklumpen gebildet, der mit der Pipette zusammen verworfen wird. Die defibrinierte Knochenmarkssuspension verbleibt in dem Polyäthylenröhrchen.

2. Zellisolierung und Zellzählung

2.1 Isolierung kernhaltiger Zellen aus dem peripheren Blut

Die Isolierung der Zellen erfolgt nach Wilmanns (18 - 21). Das wie unter 1.1 (S.9) gewonnene venöse Blut wird schrägstehend bei 37° C im Wasserbad 30 Minuten lang inkubiert. Den gesamten Überstand hebt man mit einer silikonisierten Pipette ab und gibt ihn in ein Plastikröhrchen. Die weitere Verarbeitung erfolgt wie beim Knochenmark (vgl.III.-2.2,S.12).

2.2 Isolierung kernhaltiger Zellen aus dem Knochenmark

Zur Isolierung der Knochenmarkszellen werden folgende Lösungen benötigt:

0,83 % NH_4Cl-Lösung

Für die Herstellung werden 0,83 g Ammoniumchlorid zu 100 ml aqua bidest.(Merck 1145) gegeben.

Ringer-Phosphat-Glukose-Lösung

Zur Zusammensetzung vgl. III.-1.2, S.9

5 % - MG - Titriplex - Lösung

Zusammensetzung vgl. III.-1.1, S. 9

Die Isolierung der Knochenmarkszellen erfolgt nach der Methode von Wilmanns (18 - 21).
Dazu wird die in RPG-Mg-Titriplex (vgl.III.-1.2, S.9) aufgenommene Knochenmarkssuspension 5 Minuten lang bei 1000 rpm (6256 g) in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Temperatur soll hierfür 4°C betragen. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Erythrocyten im Sediment mit 0.83 % NH_4Cl-Lösung hämolysiert. Dazu benötigt man je nach Erythrocytenvolumen 2 - 10 ml der Lösung. Nach 5-minütigem Stehen bei 4°C wird wieder 5 Minuten lang bei 1000 rpm (6256 g) in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, und der hämoglobinhaltige Überstand verworfen. Das jetzt erythrocytenfreie Sediment wird 3 mal in RPG-Lösung gewaschen. Die zwischenzeitlichen

Zentrifugationen müssen jeweils 5 Minuten lang bei 1000 rpm (6256 g) bei 4°C erfolgen. Nach dem Waschen wird das Sediment in RPG-Lösung suspendiert.

2.3 Zellzählung

Als Voraussetzung für die Zellzählung sollte die Zellsuspension homogen aussehen und keine Zellklumpen enthalten.
In einer Erythrocytenmischpipette wird bis zur Marke 1 Zellsuspension, und danach bis zur Marke 101 3 % Essigsäure aufgezogen. Die Verdünnung beträgt damit 1 : 100.
Die Zellzählung erfolgt in der Neubauer-Kammer. Die 4 großen Eckquadrate werden einzeln ausgezählt, addiert und mit 250 multipliziert. Dann stellt man die Zellzahl durch Zugabe von RPG-Lösung bzw. kurzes Abzentrifugieren auf 100000 Zellen/mm³ ein. Dabei benutzt man folgende Beziehung:

$$\frac{\text{vorhandene Zellsuspension (ml) x gezählte Zellzahl/mm}^3}{100000 \text{ Zellen/mm}^3}$$

= gewünschte Zellsuspension (ml) mit 100000 Zellen/mm³

3. Färbung

Zur Färbung der Zellausstriche sind folgende Lösungen notwendig:

May-Grünwald-Lösung unverdünnt (Merck 1424)

Giemsa-Lösung (Merck 9204)
3 ml Giemsa ad 100 ml gepuffertes aqua dest., filtrieren

gepuffertes aqua dest. pH 7.2
Ansatz für einen Liter:
1.14 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck 6580)
0.49 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck 4873)
ad 1 l aqua bidest.
Die Pufferlösung wird auf einen pH von 7.2 eingestellt.

Die Färbung der nach der Methode I bzw. Methode II angefertigten Zellausstriche erfolgt nach der kombinierten May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim, auch "Panoptische Färbung" genannt (1,5,9,22). In unserem Labor wurde die Färbung wie folgt durchgeführt:

1. Die Objektträger mit den Präparatausstrichen werden 6 Minuten lang mit May-Grünwaldscher Lösung bedeckt. Damit erfolgt die Fixation der Ausstriche. Die Zellstrukturen erscheinen in den Farben:

Zellkerne	:	blau
eosinophile Granula	:	leuchtend ziegelrot
basophile Granula	:	tiefblau
neutrophile Granula	:	feine hellrote bis purpurrote Körnchen
Thrombocyten	:	blaßblau
Erythrocyten	:	hellrot

Die alleinige Färbung mit May-Gründwald-Lösung bringt die Granula der Granulocyten gut zur Darstellung, Kerne und Cytoplasma werden dagegen nur unvollkommen gefärbt (9).

2. Die Objektträger werden mit gepuffertem aqua dest. abgespült. Durch Auf-die-Kante-Stellen der Präparate über Fließpapier läßt man die Flüssigkeit ablaufen.

3. Jetzt erfolgt die Färbung mit verdünnter Giemsa-Lösung. Dieser Vorgang dauert 20 Minuten. Durch die Giemsa-Lösung werden die Zellstrukturen wie folgt angefärbt:

Zellkerne	:	rotviolett
eosinophile Granula	:	rötlich bis rotbraun
basophile Granula	:	blau
neutrophile Granula	:	rotviolett
Thrombocyten	:	blau mit violett - rotem Innenkörper
Erythrocyten	:	blaßrötlich
Protoplasma der Lymphocyten	:	blau evtl. mit feinen roten Azurkörnchen
Kerne von Blutparasiten und Protozoen	:	leuchtend rot

4. Danach wird der Objektträger wieder mit gepuffertem aqua dest. abgespült.

5. Anschließend erfolgt sofortiges Trocknen zwischen Filtrierpapier.

6. Zuletzt wird die Nichtschichtseite des Objektträgers gereinigt.

7. Um die Erythrocyten im Ausstrich schöner erscheinen zu lassen, können in die verdünnte Giemsa-Lösung 10 Tropfen Essigsäure und 5 Tropfen 0.1 n Salzsäure (Merck 9060) gegeben werden.

Nach vollständiger Färbung weisen die Zellstrukturen folgende Färbung auf :

Zellkerne	:	rötlich-violett
Plasma der lymphoiden Zellen	:	lichtblau
lymphoide Azurkörnchen	:	leuchtend purpurrot

myeloische Azurkörnchen	:	violett mit einem Stich ins Violett-Bräunliche
neutrophile Granula	:	bräunlich bis bläulich-rosa
eosinophile Granula	:	bräunlich-orange bis ziegelrot
basophile Granula	:	blau mit einem Stich ins Violette
Erythrocyten	:	rosa
polychrome Formen der Erythrocyten	:	überwiegend bläulich
basophile Punktierung der Erythrocyten	:	kräftig kobaltblau
Jollykörperchen	:	rötlich-violett

Bei der Färbung nach Pappenheim können folgende Fehler unterlaufen, die Schwierigkeiten in der Differenzierung der Zellausstriche nach sich ziehen (9,22):

1. Versehentliches Antrocknen der May-Grünwald-Stammlösung während der Fixierungsphase. Eine ausreichende Lösung der angetrockneten Farbe wird durch Überschichtung mit May-Gründwald-Stammlösung oder reinem Methanol erreicht.
2. Dauert die Färbung mit der Giemsa-Gebrauchslösung zu lange, bildet sich eine metallisch glänzende Oberfläche, die aus ausgefallenem Farbstoff besteht. Diese Farbniederschläge bleiben auf dem Präparat haften, falls am Ende der Färbung nicht zuerst gespült und dann abgekippt, sondern umgekehrt vorgegangen wird.
3. Ist das verwendete Wasser zu sauer entsteht eine Rotstichigkeit des gefärbten Zellausstriches, ist es zu alkalisch eine Blaustichigkeit.

4. Einbauraten von DNS-Vorstufen in die DNS von Blut- und Knochenmarkszellen

4.1 Isolierte Zellen (Methode I)

4.1.1 Testansätze

Zur Ermittlung der Einbauraten sind folgende Lösungen und Materialien notwendig.
Lösungen:
TC minimal Medium eagle modified (Difco 5838-72, 100 ml)

TC Horse Serum desicc (Difco 5357-57)
In 5 ml aqua bidest. auflösen und in 1 ml Portionen einfrieren. Aufgetautes Serum ist 1 Woche bei 4°C haltbar.

TC Glutamin 5 % (Difco 5789-59)
50 mg Glutamin abwiegen und in 1 ml aqua bidest. in der Wärme lösen (täglich neu ansetzen).

Für die Testansätze täglich vorbereiten:
9.5 ml Medium + 0.5 ml Horse Serum

5 % Trichloressigsäure (20% Trichloressigsäure, Merck 9415, 1 : 4 Verdünnung)

0.1 N Salzsäure (Merck 9060)

Scintillationslösung: 2.5 l Toluol (Merck 8325)
+ 10 g Omnifluor (NEN Chemicals GmbH, Nef 906)

Zelluloseazetatfilter (Millipore HAWP 02500 HA 0.45 µ, 25 mm, glatt, weiß)

Radioaktive Lösungen:
^{3}H-Thymidin (dTR) Spez.Akt.: 2 Ci/mMol, radioakt. Konz. 1 mCi/1 ml (Buchler TRA 306)

^{3}H-Deoxiuridin (dUR) Spez.Akt.: 10 Ci/mMol, radioakt. Konz. 1 mCi/1 ml (Buchler TRK 242)

Unmarkierte Lösungen (jeweils 10^{-4} M):

Thymidin-Lösung: 2.42 mg ad 100 ml aqua bidest.
(Fluka 89270, 1 g)

Deoxiuridin-Lösung: 2.55 mg ad 100 ml aqua bidest.
(Serva 18620, 50 mg)

Scintillationsgefäße: (Polyäthylen LsC-Vials with caps
Code Nr.5021,NEF 938, NEN Chemicals GmbH)

Die hier benutzten Gebrauchslösungen von ^{3}H-dTR bzw. ^{3}H-dUR haben folgende Zusammensetzung:

^{3}H-dTR (Thymidin)

sepz.Aktivität	: 2 Ci/mMol		
radioaktive Konzentration	: 1 mCi/ml		
MG von Thymidin	: 242		
^{3}H-dTR	: 0.5 mCi/0.5 ml	≙ 0.25 µMol	0.5 ml
dTR	: 242 mg/l	= 1.00 mMol/l	
	2,42 mg/100 ml	= 0.01 mMol/100 ml	
		= 10 µMol/100 ml	
		= 1 µMol/ 10 ml	
		= 0.75 µMol/7.5 ml	7.5 ml
aqua bidest.:	2.0 ml		2.0 ml
			10.0 ml

Summe:

1.0 µMol Thymidin/10 ml = 0.5 mCi/10 ml
= 1.0 nMol Thymidin/10 µl = 0.5 µCi/10 µl
= 10^{-4} M dTR (spez.Aktivität : 0.5 mCi/mMol)

Ansatz:

2.0 nMol Thymidin/20 µl ≙ 1 µCi pro Ansatz
= 2 x 10^{-6} M Thymidin im Testansatz

^{3}H-dUR (Deoxiuridin)

spez.Aktivität : 10 Ci/mMol
radioaktive Konzentration : 1 mCi/ml
MG von Deoxiuridin : 228

^{3}H-dUR : 0.5 mCi/0.5 ml	≙	0.05 µMol	0.5 ml
dUR : 228 mg/l	=	1.00 mMol/l	
2.28 mg/100 ml	=	0.01 mMol/100 ml	
	=	10 µMol/100 ml	
	=	0.95 µMol/9.5 ml	9.5 ml
			10.0 ml

Summe:

1.0 µMol dUR/10 ml = 0.5 Ci/10 ml
= 1.0 nMol dUR/10 µl = 0.5 µCi/10 µl
= 10^{-4} M dUR (spez.Aktivität) = 0.5 mCi/mMol

Ansatz:

2.0 nMol Deoxiuridin/20 µl = 1 µCi pro Ansatz
= 2 x 10^{-6} M Deoxiuridin im Testansatz

Die Ermittlung der Einbauraten erfolgt nach der Methode von Wilmanns (18 - 21).
Zunächst werden von der - wie auf Seite 12,13 unter III.-2.1, 2.2 beschrieben - gewonnenen Zellsuspension (100000/mm³) 20 µl zum Ansatz verwandt. Der Testansatz für den Hauptwert bzw. Leerwert setzt sich wie folgt zusammen:

	Leerwert	Hauptwert
Glutamin	0.05 ml	0.05 ml
Mediumgemisch	0.93 ml	0.91 ml
Zellsuspension	-	0.02 ml
^{3}H-dTR (^{3}H-dUR) -Gebrauchslösung	0.02 ml	0.02 ml

Die Proben werden gemischt und zwei Stunden lang im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Sofort nach Beendigung der Inkubation wird die Reaktion durch Abkühlen im Eis gestoppt.
Zur Gewinnung des Standards werden vom Leerwert 20 µl entnommen und auf ein Millipore - Filterscheibchen pipettiert, das anschließend sofort getrocknet wird. Leer- und Hauptwert werden nach Entnahme des Standards in der Milliporeanlage ausgewaschen. Hierzu pipettiert man den gesamten Ansatz auf ein Filterscheibchen und wäscht ihn zunächst 3 mal mit 2.0 ml eiskalter 5% Trichloressigsäure und danach 3 mal mit 2.0 ml eiskalter 0.1 n Salzsäure. Anschließend werden die Millipore-Filterscheibchen in Szintillationsgefäße gegeben und 30 Minuten lang bei 80° C getrocknet. Nach Abkühlung gbit man 5 ml Omnifluor in jedes Szintillationsgefäß. Nach einer weiteren Abkühlung im Kühlschrank oder Szintillationszähler für ca. 30 Minuten erfolgt die Zählung im Packard-Gerät.

4.1.2 Berechnung der Einbauraten

Der Leerwert enthält 0.02 ml Gebrauchslösung ^{3}H-dTR (^{3}H-dUR). 20 µl davon werden für den Standard gebraucht. Danach ergibt sich folgende Berechnung:

Leerwert: 2.0 nMol Thymidin (Deoxiuridin)/1000 µl
Standard = 1/50 vom Leerwert
= 0.04 nMol Thymidin (Deoxiuridin)/20 µl
Standard x 25 = 1 nMol Thymidin (Deoxiuridin)
Δ cpm = Zählrate des Hauptwertes - Zählrate des Leerwertes
cpm_{STD} = Zählrate des Standards

Damit folgt für die Zählrate:

$$\frac{\Delta \text{ cpm}}{cpm_{STD} \times 25} = \frac{x \text{ nMol Thymidin (Deoxiuridin)}}{1 \text{ nMol Thymidin (Deoxiuridin)}}$$

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellen und Bezug des Ergebnisses auf 10^{10} Zellen (Multiplikation mit 1000) ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{\Delta \text{ cpm} \times 1000}{\text{cpm}_{STD} \times 25 \times \text{eingesetzte Zellen } (10^7)}$$

$$= \frac{\Delta \text{cpm} \times 40}{\text{cpm}_{STD} \times \text{eingesetzte Zellen } (10^7)}$$

= nMol eingebautes ^{3}H-dTR (^{3}H-dUR)/2 h x 10^{10} Zellen

4.2 Nicht isolierte, defibrinierte Zellsuspensionen (Methode II)

Die Messung der Einbauraten erfolgt nach der Methode von Sauer (10 - 17).

4.2.1 Testansätze

Das Vorgehen ist bei defibrinierten Zellsuspensionen aus peripherem Blut und aus Knochenmark identisch. Die notwendigen Lösungen sind unter III.-4.1.1, S.17 aufgeführt. Außer den defibrinierten Zellsuspensionen (vgl.III.-1.3,1.4, S.10) werden 5 ml Nativblut von demselben Patienten gewonnen, um autologes Serum zu erhalten. Man bestimmt die Anzahl kernhaltiger Zellen (vgl. III.-2.3, S.13) in den defibrinierten Suspensionen und stellt sie mit dem autologen Serum auf 10000 bis 20000 Zellen/mm³ ein. Die Testansätze sind wie folgt (im Eis!):

90 µl Zellsuspension + 10 µl ^{3}H-dTR
90 µl Zellsuspension + 10 µl ^{3}H-dTR
90 µl Zellsuspension + 10 µl ^{3}H-dUR
90 µl Zellsuspension + 10 µl ^{3}H-dUR

Die Zusammensetzung der Gebrauchslösungen entspricht der Beschreibung unter III.-4.1.1, S.18. Demnach entsprechen 10^{-5} M dTR (dUR) o.5 µCi ^{3}H pro Ansatz.

Nach Mischung gewinnt man aus der noch gekühlten Suspension Nullwerte, indem 20 µl Zellsuspension in 100 µl eiskalte 0.9 % NaCl-Lösung gegeben werden. Nach einer Inkubation von 60 bzw. 120 Minuten bei 37° C im Wasserbad werden erneut je 20 µl entnommen und in 1000 µl eiskalte 0.9 % NaCl-Lösung gegeben. Die Suspensionen in NaCl werden je 3 mal mit 2 ml 5 % Trichloressigsäure und mit 2 ml 0.1 n Salzsäure auf Millipore-Filtern gewaschen. Der genaue Vorgang findet sich unter III.-4.1.1, S.17. Danach läßt man die Proben eine halbe Stunde trocknen und füllt anschließend mit 5 ml Omnifluorszintillatorlösung auf. Jetzt erfolgt der Zählvorgang (vgl.III.-4.1.1, S.17). Die Zählraten der Nullwerte werden von dem 1 h - Wert bzw. 2 h - Wert abgezogen. Man erhält $\Delta\ cpm_{1h}$ und $\Delta\ cpm_{2h}$, die auf einer Geraden liegen, die den Nullpunkt schneidet.

4.2.2 Berechnung der Einbauraten

Die Zählraten werden auf 10^3 Zellen bezogen (cpm/10^3 Zellen). Weitere Berechnungen siehe IV.-2.1., Seite 36.

5. Patienten

Die Untersuchungen fanden in der Zeit vom 23.1.1979 bis 15.11.1979 statt.
Es handelt sich um 24 Patienten (8 Frauen, 16 Männer). Das Durchschnittsalter der Frauen liegt bei 53.9 Jahren (Jahrgang 1908 - 1951), das der Männer bei 64.1 Jahren (Jahrgang 1896 - 1961).
Die Patienten kamen auf Grund folgender Erkrankungen in die Klinik:

5 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (1 w, 4 m)
10 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (4 w, 6 m)
1 Patient mit chronischer myeloischer Leukämie bei bisher bestehender Polycythämia vera (m)
3 Patienten mit perniciöser Anämie (1 w, 2 m)
1 Patient mit Erythroleukämie (m)
2 Patienten mit aplastischer Anämie (1 w, 1 m)
2 Patienten mit makrocytärer Anämie (1 w, 1 m)

Ein Teil der Patienten wurde während der Untersuchungszeit nur einmal, andere hingegen öfter punktiert. Von den letztgenannten Patienten konnten deshalb mehrere Zellsuspensionen untersucht werden. Während bei einigen Patienten sowohl Knochenmark, als auch peripheres Blut zur Untersuchung kamen, liegt bei den anderen Patienten nur eine der beiden Bestimmungen vor.
Insgesamt wurde 25 mal Knochenmark (8 w, 17 m) und 21 mal peripheres Blut (3 w, 18 m) untersucht. Bezüglich der unterschiedlichen Erkrankungen ergibt sich folgende Verteilung:

	KM-Präparate	PBL-Präparate
AML	13	5
ALL	2	16
CML	1	-
perniciöse Anämie	4	-
Erythroleukämie	1	-
aplastische Anämie	2	-
makrocytäre Anämie	2	-
Σ	25	21

Tab. 1
Anzahl der Untersuchungen des Knochenmarks und des peripheren Blutes bei unterschiedlichen Erkrankungen.

Von zwei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie liegen Untersuchungsreihen vor.

M.E. (m), geb. 18.10.1961
In der Zeit vom 8.2.1979 - 26.2.1979 wurde 8 mal peripheres Blut untersucht.

K.T. (m), geb. 18.9.1961
In der Zeit vom 23.5.1979 - 1.6.1979 wurde 6 mal peripheres Blut untersucht.

IV. Ergebnisse

1. Zelldifferenzierung

1.1 Morphologische Einteilung der Zellen

Da nur proliferierende Zellen radioaktives Material einbauen können, war eine Differenzierung der Zellbilder erforderlich. Von jeder Zellsuspension, in der die Einbauraten bestimmt wurden, standen zwei nach Pappenheim gefärbte Präparate zur Verfügung. Diese sind mit a bzw. b bezeichnet. Da sich zwischen a bzw. b keine erheblichen Unterschiede ergaben, wurden für die Auswertung jeweils die Mittelwerte verwendet. Die Differenzierung der Präparate erfolgte nach folgendem Schema:

Name:	Nr.:							Präparat vom X.Y.1979			
Zellart	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	%
(Myelo-) Blasten											
Promyelocyten											proliferierende Zellen
Myelocyten											
Metamyelocyten											
Stabkernige											
Segmentkernige											
Monocyten											
Lymphocyten											
sonstige Zellen											
Proerythroblasten											proliferierende Zellen
Erythroblasten											
Normoblasten											
nicht klassifizierbare Zellen											
zerstörte Zellen											
Gesamtzahl proliferierender Zellen											

Tab.2

Differenzierungsschema der Zellbilder

Bei der Zellzählung wurden die (Myelo-) Blasten, Promyelocyten und Myelocyten bzw. die Proerythroblasten und Erythroblasten zur Gruppe der proliferierenden Zellen zusammengefaßt. Die Gruppe der nicht klassifizierbaren bzw. zerstörten Zellen ging dagegen nicht mit in die Berechnung des Anteils proliferierender Zellen ein, da beide Gruppen Zellen enthalten, die nicht einer bestimmten Zellklasse zugeordnet werden konnten. Die Gruppe der zerstörten Zellen war auf Grund des hohen Zerstörungsgrades nicht in der Lage radioaktives Material einzubauen. Diese Zellen spielen für die Bestimmung der Einbauraten keine Rolle. Der Anteil der nicht klassizifierbaren Zellen betrug im Schnitt 1.9 % (in einem Präparat 30 %, wahrscheinlich Differenzierungsfehler, da nur wenige Zellen vorhanden und diese auf Grund des Zerstörungsgrades kaum zu differenzieren waren). Deshalb ist der Fehler, der durch die vernachläßigten proliferierenden Zellen dieser Gruppe bei Ermittlung des Gesamtanteils proliferierender Zellen entsteht, vernachläßigbar.

Bezüglich des Anteils proliferierender Zellen wurden verglichen:
unbearbeitetes KM (PBL)
isolierte KM - (PBL) Zellen (Methode I)
nicht isoliertes (defibriniertes) KM (PBL) (Methode II)

1.2 Zählergebnisse

Die statistische Berechnung zum proliferierenden Anteil der KM- bzw. PBL-Ausstriche findet sich im Anhang unter Tab.$_{A}$1 - 6, S.84 - 86.

Die mit ● gekennzeichnten Angaben für n unterscheiden sich von denen in Tab.1, S.24. Bei diesen Präparaten sind bezüglich der unbearbeiteten Ausstriche keine Angaben vorhanden; bezüglich der isolierten Ausstriche war eine Auszählung der Zellen nicht möglich (vgl.Tab.4, S.32).

Für die KM-Ausstriche ergaben sich folgende Mittelwerte bezüglich der prozentualen Verteilung der proliferierenden Zellen:

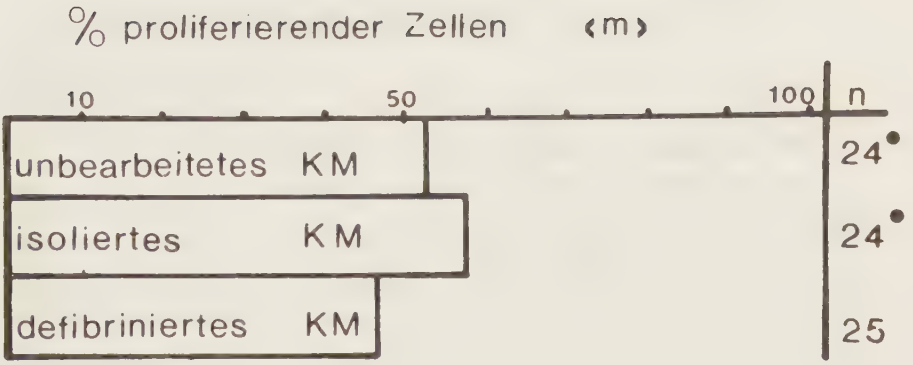


Abb. 5
% proliferierender Zellen in allen KM-Ausstrichen (Mittelwerte)

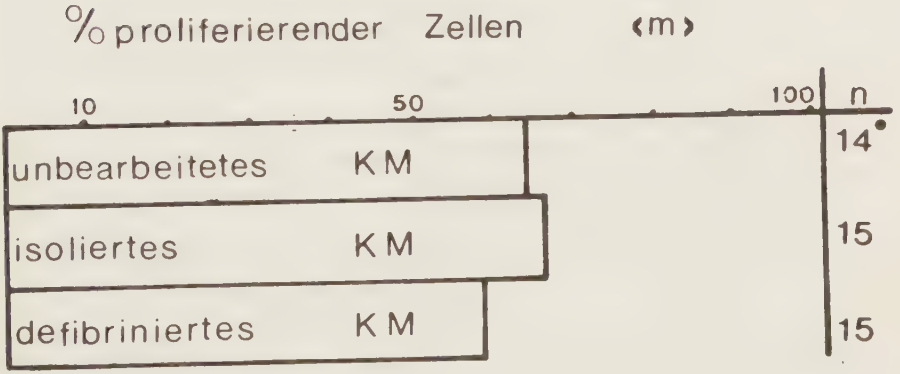


Abb. 6
% proliferierender Zellen in Knochenmarksausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien (Mittelwerte)

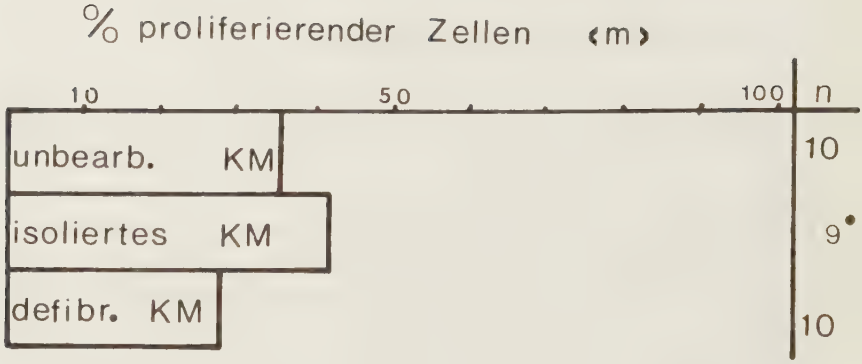


Abb. 7
% proliferierender Zellen in Knochenmarksausstrichen von Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen (Mittelwerte)

Diese Zellen stammen von Patienten mit folgenden Erkrankungen (vgl. III.-5., S.23):

1 Patient mit chronischer Leukämie
3 Patienten mit perniciöser Anämie
1 Patient mit Erythroleukämie
2 Patienten mit aplastischer Anämie
2 Patienten mit makrocytärer Anämie

Für die PBL-Ausstriche von Patienten mit akuten Leukämien ergaben sich folgende Mittelwerte bezüglich der prozentualen Verteilung der proliferierenden Zellen:

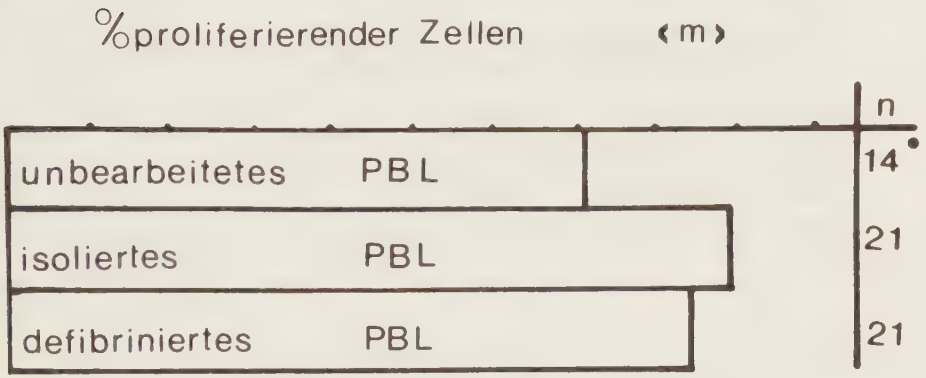


Abb. 8
% proliferierender Zellen in PBL-Ausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien (Mittelwerte)

Neben dem Anteil der proliferierenden Zellen wurde bei den Patienten mit akuten Leukämien auch der prozentuale Anteil der Blasten im KM und PBL ermittelt.

Für die KM-Ausstriche ergaben sich folgende Mittelwerte bezüglich der prozentualen Verteilung der Blasten:

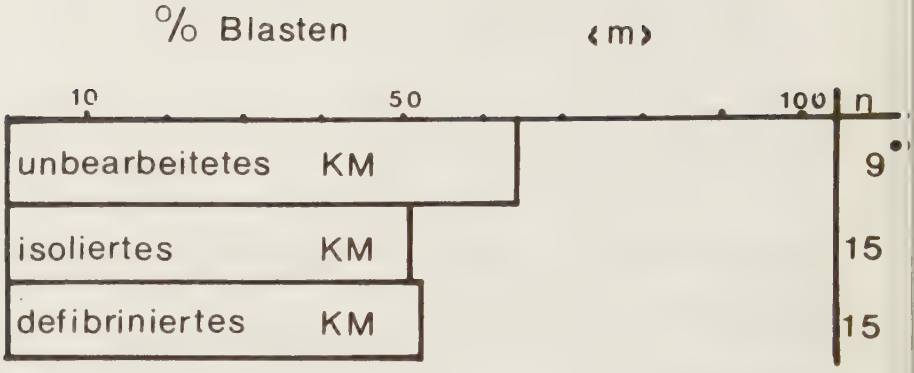


Abb. 9
% Blasten in Knochenmarksausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien (Mittelwerte)

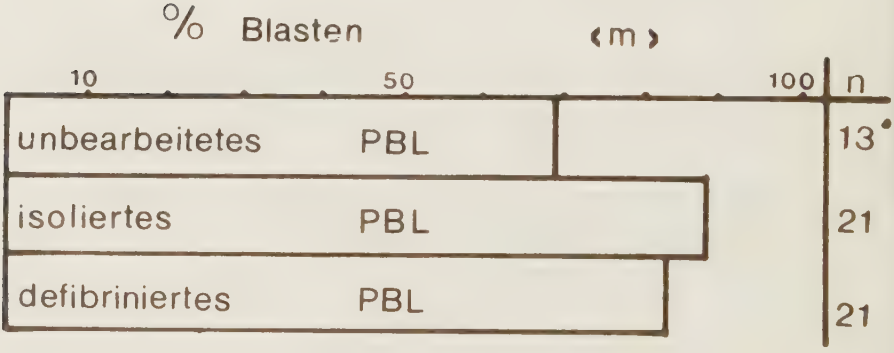


Abb. 10
% Blasten in Blutausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien (Mittelwerte)

1.3 Probleme bei der Zelldifferenzierung

1.3.1 Anfertigung

Zum Teil lagen stark verschmutzte oder aber sehr dicke, kaum differenzierbare Ausstriche vor.

1.3.2 Anzahl und Zerstörungsgrad der Zellen

Einige Präparate konnten wegen zu geringer Zellzahl nicht ausgezählt werden. Bei anderen waren bis zu 95 % der Zellen zerstört und lagen nur noch als sogenannte Kernschatten vor. Über die Morpholgie dieser Zellen bzw. ihre Einbaufähigkeit von dTR und dUR konnte man keine Aussage machen (vgl.IV.-1.1, S. 25,26).

Für den Zerstörungsgrad der Zellen bezüglich der unterschiedlichen Erkrankungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

% der Zellzerstörung

Erkrankung		Methode I		Methode II	
	n	$\bar{x}$	Streubereich	$\bar{x}$	Streubereich
AML (KM)	13	80	60 - 90	3	0 - 17
AML (PBL)	5	87	70 - 98	3	0 - 5
ALL (KM)	2	50	50	5	0 - 10
ALL (PBL)	16	86	50 - 99	9	2 - 27

Tab. 3
Zerstörungsgrad der Zellen bei Patienten mit akuten Leukämien.
Bezüglich der Anzahl der Präparate vgl. Tab. 1, S. 24.

Bei den Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen trat der Zerstörungsgrad und die geringe Zellzahl besonders deutlich hervor. Deshalb werden die Zählergebnisse bei entsprechenden Fällen für die Präparate a und b aufgeführt.

Zellanzahl und % der Zellzerstörung

Erkrankung	n	Methode I	Methode II
CML	1	20 %	2 %
Erythroleukämie	1	70 %	18 %
perniciöse Anämie	4		
Fall I			
Präparat a,b		wenig Zellen, diese alle zerstört, nicht auszählbar!	2 %
Fall II			
Präparat a		wenig Zellen, 92% zerstört, nicht auszählbar!	2 %
Präparat b		wie a, 50 Zellen ausgezählt	2 %
Fall III			
Präparat a,b		wenig Zellen, 90 % zerstört	wenig Zellen, kaum zerstört
Fall IV			
Präparat a		80 %	wenig Zellen, kaum zerstört
Präparat b		die meisten Zellen zerstört, nicht auszählbar!	wie Präparat a
Aplastische Anämie	2		
Fall I			
Präparat a		fast nur zerstörte Zellen, 50 Zellen ausgezählt	9 %
Präparat b		nicht auszählbar!	9 %
Fall II			
Präparat a		50 % zerstört, Rest gut differenzierbar	vereinzelt zerstörte Z.gut diffb.
Präparat b		70 % zerstört, 50 Zellen ausgezählt	wie Präparat a
Makrocytäre Anämie	2		
Fall I			
Präparat a		50 Z. ausgezählt	5 %
Präparat b		viele halbzerst.Z. u.U. noch DNS-Stoffw.	5 %
Fall II			
Präparat a,b		80 % zerst.Z., Rest gut differenzierbar	vereinzelt zerst. Z. gut diffbar

Tab. 4

Tab. 4
Zerstörungsgrad und Anzahl der Zellen bei Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen. Bezüglich der Anzahl der Präparate vgl.Tab. 1, S.24.

In der Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen ergaben sich insbesondere Unterschiede in der Anzahl der Erythroblasten und Normoblasten bezüglich der beiden Methoden. Als Durchschnittswerte wurden ermittelt:

Erythroblasten		Normoblasten	
Methode I	Methode II	Methode I	Methode II
0,75 %	12,63 %	--	21,25 %

Tab. 5
Prozentualer Anteil der Erythroblasten und Normoblasten bezüglich der Methoden I und II bei Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen.

Die genauere Verteilung in Bezug auf die Patienten mit perniciöser Anämie wird unter Punkt IV.-3, S.65 besprochen.

1.3.3 Unterschied der Methoden I und II

Die nach der Methode I angefertigten Präparate waren wesentlich schwieriger zu differenzieren als die nach der Methode II. Bei den nach der Methode I angefertigten Präparaten lagen nahezu immer wenigstens 50 % der Zellen zerstört, die restlichen nur in Zellhaufen vor. Andere Zellen waren auf Grund der starken Verschmutzung der Präparate kaum zu erkennen.
Im Gegensatz dazu boten die nach der Methode II angefertigten Präparate durchweg klare gut zu differenzierende Zellbilder.

Zur Verdeutlichung dienen folgende Aufnahmen:

Abb. 11 a

KM-Ausstrich nach Anwendung von Methode I

Vergrößerung: 250-fach, Erkrankung: AML

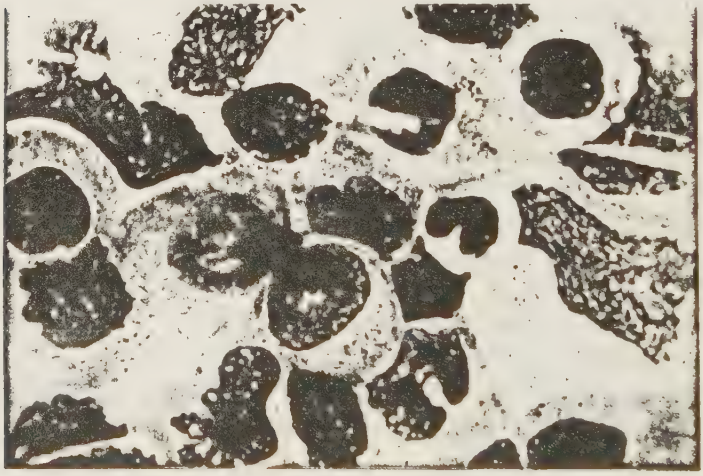


Abb. 11 b

Ausschnittsvergrößerung aus obigem Foto, Vergrößerung: 1000-fach

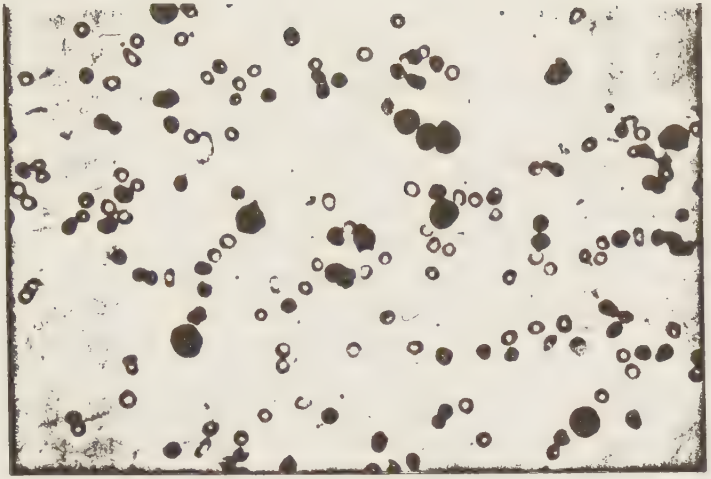


Abb. 11 c

KM-Ausstrich nach Anwendung von Methode II

Vergrößerung: 250-fach, Erkrankung: AML

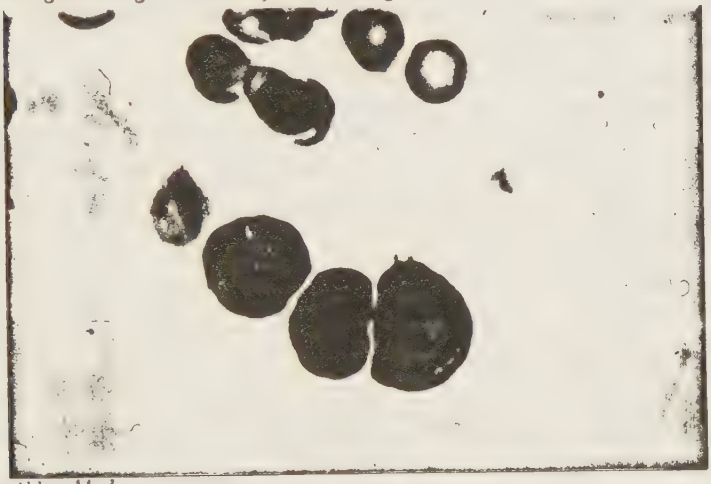


Abb. 11 d

Ausschnittsvergrößerung aus obigem Foto, Vergrößerung: 1000-fach

Abb. 11 a - 11 d

Vergleichende Aufnahmen der nach der Methode I und II angefertigten Zellpräparate. Es handelt sich um die Ausstriche eines Patienten mit AML von KM nach Anwendung von Methode I bzw. Methode II

2. Vergleich der Ergenisse der Bestimmung der DNS-Stoffwechselaktivität

2.1 Mathematische Umformungen

Es wurden 46 Meßergebnisse ermittelt, davon 25 Knochenmarksproben und 21 Proben des peripheren Blutes (vgl.Tab.1, S.24). Die Einbauraten von ^{3}H-dTR bzw. ^{3}H-dUR bei den nach der Methode I angefertigten Zellsuspensionen lag in der Form nMol/2h x 10^{10} Zellen vor (vgl.III.-4.1.2, S.20). Die Methode II lieferte die Ergebnisse in cpm/h x 10^3 Zellen (vgl.III.-4.2.2, S.22). Um die Werte der beiden Methoden vergleichen zu können, wurden sie auf eine gemeinsame Einheit gebracht (nMol/h x 10^{10} Zellen). Dazu waren folgende mathematischen Umformungen erforderlich:

Methode I:
Da die Inkubationsdauer hier 2 Stunden betrug, müssen die Ergebnisse durch 2 dividiert werden.
1/2 x Meßergebnis (nMol/2h x 10^{10} Zellen)
= Meßergebnis (nMol/ h x 10^{10} Zellen)

Methode II:
Zur Berechnung werden die für Methode I angefertigten Standards benutzt (vgl.III,-4.1.2, S.20).
Berechnung (vgl.III.-4.2.1, S.20):

$\Delta\ cpm_{1h}/10^3$ Zellen = x nMol/h x 10^3 Zellen

cpm_{STD} x 25 = 1 nMol

daraus folgt:

$$x\ \text{nMol/h x } 10^3\ \text{Zellen} = \frac{\Delta\ cpm_{1h}/10^3\ \text{Zellen x 1 nMol}}{cpm_{STD} \times 25}$$

Da sich die Methode I auf 10^{10} Zellen bezieht, muß der obige Quotient mit 10^7 beidseits multipliziert werden.

$$x \text{ nMol/h} \times 10^{10} \text{ Zellen} = \frac{(\triangle \text{ cpm}_{1h}/10^3 \text{ Zellen}) \times 1 \text{ nMol} \times 10^7}{\text{cpm}_{STD} \times 25}$$

$$= \frac{\triangle \text{ cpm}_{1h} \times 4 \times 10^7}{\text{cpm}_{STD}}$$

Die Meßergebnisse der beiden Methoden wurden mit Hilfe der oben genannten Gleichungen umgerechnet.

2.2 Ergebnisse der Methode I und II

2.2.1 Untersuchung auf einen mathematischen Zusammenhang

Die Ergebnisse der Einbauaktivitäten der nach der Methode I und II angefertigten Zellsuspensionen wurden gegeneinander aufgetragen.

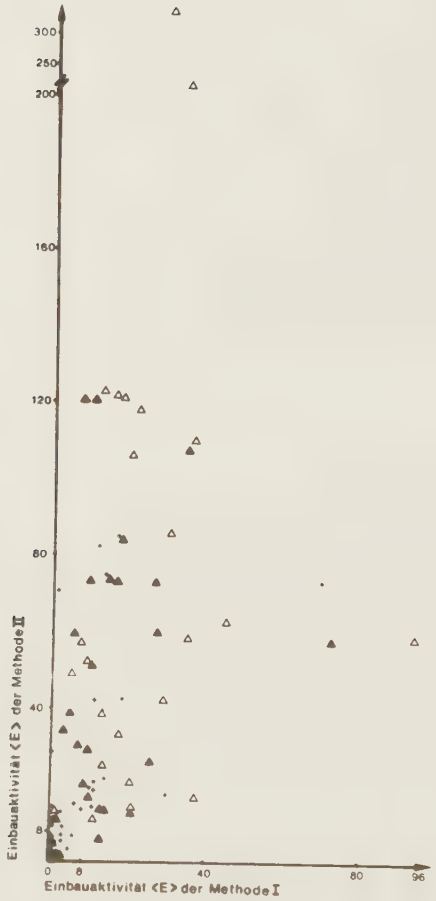


Abb. 12

Meßwerte der Methode I (Abszisse) gegen Meßwerte der Methode II (Ordinate).

E = nMol/h×10^{10} Zellen

▲ : dTR KM △ : dUR KM

● : dTR PBL + : dUR PBL

Wie aus Abb. 12 folgt läßt sich zwischen den Meßergebnissen der beiden Methoden keine lineare Beziehung herleiten.

Bisher sind alle in der Neubauer-Kammer zählbaren Zellen in die Berechnung der Einbauraten mit eingegangen (vgl.III.-2.3, S.13). Da aber nur die proliferierenden Zellen in der Lage sind, radioaktives Material einzubauen, wurden die Meßwerte auf den prozentualen Anteil proliferierender Zellen umgerechnet.

Dabei wurde folgende Umformung benutzt:

$$\text{Umrechnungsfaktor: } \frac{1}{\%\text{ proliferierender Zellen}} \times 100$$

Umrechnungsfaktor x Meßwert = Meßwert bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

Die so gewonnenen Werte wurden wieder gegeneinander aufgetragen.

Abb. 13

Meßwerte der Methode I (Abszisse) gegen Meßwerte der Methode II (Ordinate) unter Berücksichtigung des proliferierenden Anteils der Zellen.

Einheit und Zeichenerklärung wie in Abb. 12, S. 38.

Abb. 13 zeigt, daß auch unter Berücksichtigung des Anteils proliferierender Zellen keine eindeutige mathematische Beziehung bezüglich der beiden Methoden aufgestellt werden kann.

Aus Abb. 12 und 13 geht hervor, daß sich die Einbauraten für dTR bzw. dUR für KM und PBL in unterschiedlichen Wertebereichen befinden. Deshalb soll diese Verteilung genauer untersucht werden.

2.2.2 Prozentuale Verteilung der Stoffwechselaktivitäten

Für die Werte der Einbauaktivitäten ergaben sich folgende prozentuale Verteilungen (vgl. Abb. 14 - 19, S. 41 - 47)
(vgl. Anhang Tab. $_{A}7$ - 14, S. 87 - 90 , E = Einheit = nMol/h x 10^{10} Zellen):

Abb. 14 a - c
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I (Methode II) behandelten KM-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

: dTR : dUR

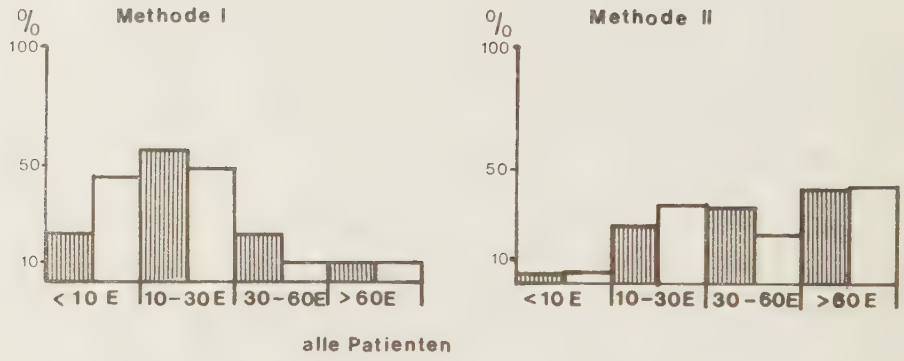


Abb. 14 a
Alle Patienten

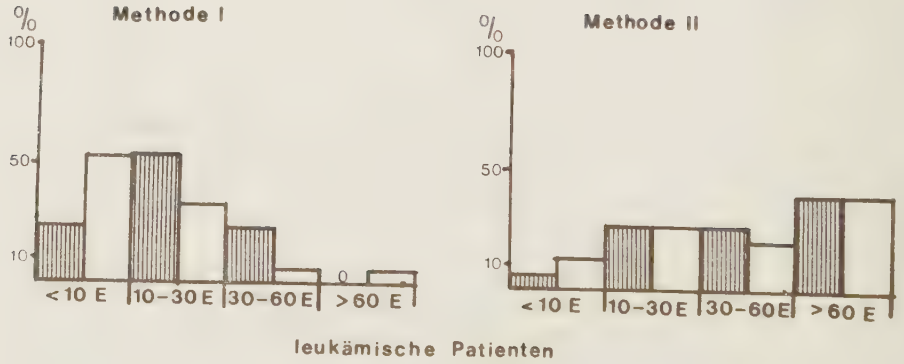


Abb. 14 b
Akut leukämische Patienten

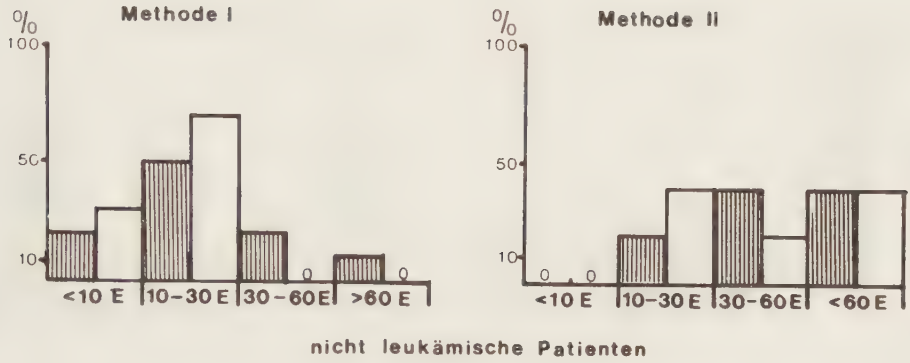


Abb. 14 c
Nicht akut leukämische Patienten

Abb. 15 a - c
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I (Methode II) behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

: dTR : dUR

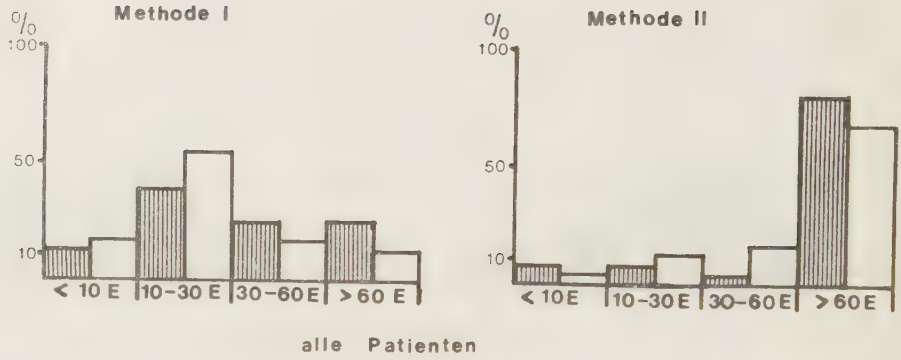


Abb. 15 a
Alle Patienten

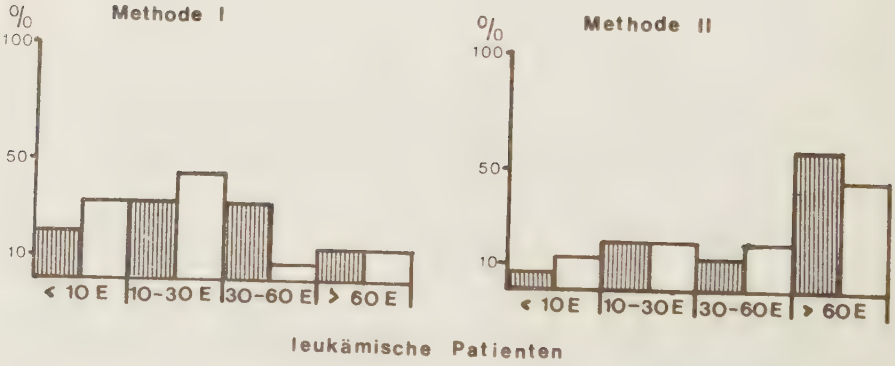


Abb. 15 b
Akut leukämische Patienten

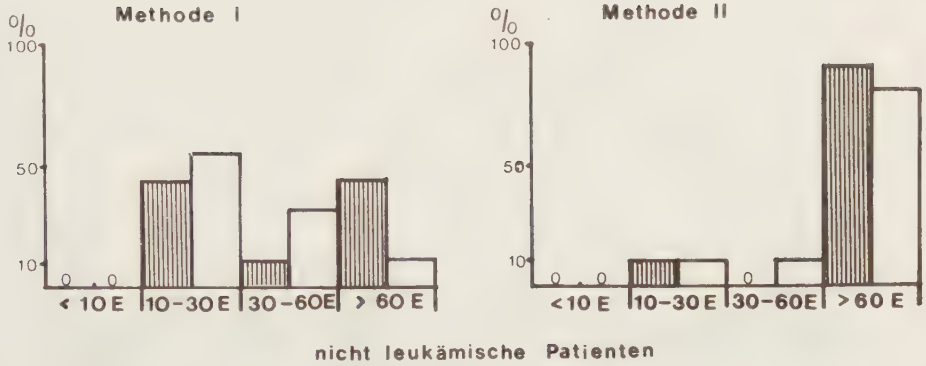


Abb. 15 c
Nicht akut leukämische Patienten

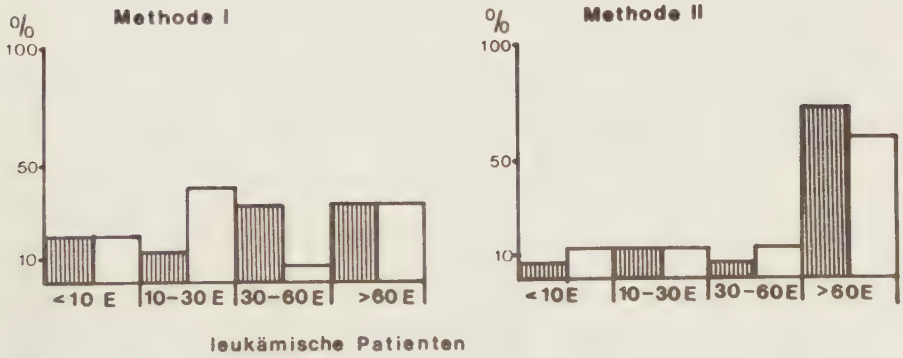


Abb. 16
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I (Methode II) behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil der Blasten. (Nur bei Patienten mit akuten Leukämien)

: dTR : dUR

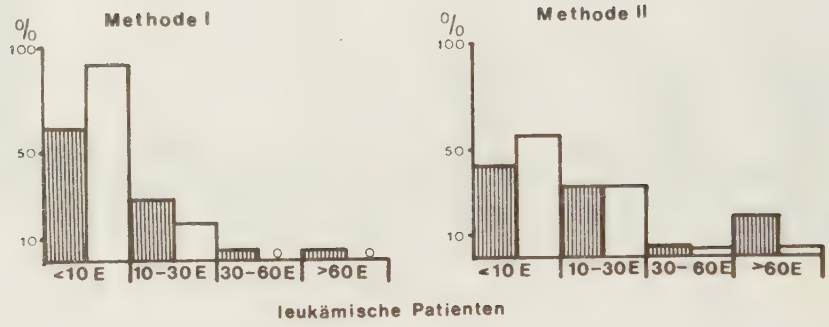


Abb. 17

Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I (Methode II) behandelten peripheren Blutzellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

(Nur Patienten mit akuten Leukämien)

: dTR : dUR

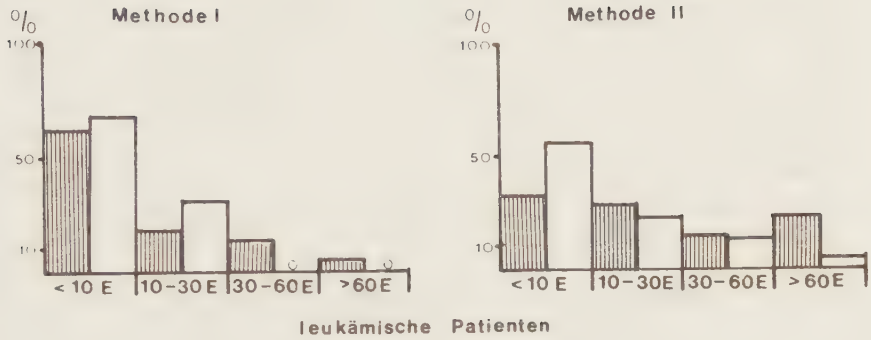


Abb. 18
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I (Methode II) behandelten peripheren Blutzellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen. (Nur Patienten mit akuten Leukämien).

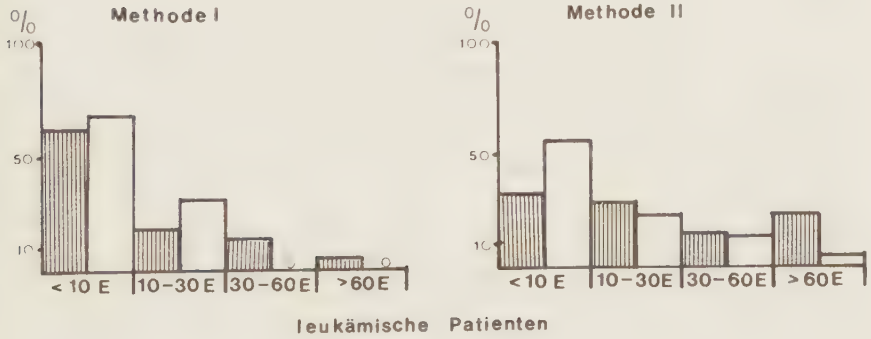


Abb. 19
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I (Methode II) behandelten peripheren Blutzellen, bezogen auf den Anteil Blasten. (Nur Patienten mit akuten Leukämien).

Betrachtet man die prozentuale Verteilung der Einbauraten unter Berücksichtigung aller KM-Zellen (vgl.Abb.14 a - c, S.41 - 43), wird deutlich, daß bei den nach der Methode I behandelten KM-Zellen das Maximum der Verteilung für dTR und dUR im Bereich zwischen 10 - 30 E liegt. Dieses trifft sowohl für die Gesamtheit der Patienten, als auch für die beiden Gruppen nicht akut leukämische - akut leukämische Patienten zu. Im Vergleich dazu finden sich bei den nach der Methode II behandelten Knochenmarkszellen für die entsprechenden Patientengruppen Verteilungsmaxima im Bereich $>$ 60 E. Nach Aufteilung der Gesamtgruppe der Patienten wird deutlich, daß bei den Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen kein Wert der Einbauaktivität von dTR oder dUR unter 10 E liegt. Dieses trifft bezogen auf die Gesamtzellzahl nur bei Anwendung der Methode II zu.

Berücksichtigt man den Anteil proliferierender KM-Zellen (vgl. Abb. 15 a - c, S. 43 - 45) findet man bei Benutzung der Methode I in der Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen keinen Wert der Einbauaktivität unter 10 E. Außerdem werden in allen Gruppen sowohl bei Anwendung von Methode I, als auch Methode II, die Einbauaktivitätswerte in höhere Bereiche verschoben. Zudem tritt der Unterschied zwischen Methode I und II noch deutlicher hervor. Nach Berücksichtigung des Anteils proliferierender Zellen liegen bei den nicht akut leukämischen Erkrankungen 30 % mehr Einbauaktivitätswerte im Bereich von 60 E als bei den Patienten mit akut leukämischen Erkrankungen. Berücksichtigt man in der Gruppe der akut leukämischen Patienten den Anteil der Blasten (vgl.Abb.16, S. 45), tritt bei beiden Methoden im Vergleich zu den proliferierenden Zellen eine deutliche Verschiebung zu höheren Aktivitätswerten auf; dabei zeigt Methode II klarere Ergebnisse.

Die peripheren Blutzellen stammen ausschließlich von Patienten mit akuten Leukämien. Hier finden sich bei Berücksichtigung der Gesamtzellzahl (vgl.Abb. 17, S. 46) nur geringe Unterschiede in der Anwendung der beiden Methoden.

Bei Verwendung von Methode II liegen die Einbauaktivitäten in etwas höheren Bereichen als bei Verwendung von Methode I. Bezieht man sich auf den Anteil proliferierender Zellen (vgl.Abb.18, S.47), ergibt sich für beide Methoden eine leichte Verschiebung in höhere Aktivitätsbereiche.
Die Einbauaktivitäten bezogen auf den Anteil der Blasten (vgl. Abb.19, S.47) sind denen der proliferierenden Zellen identisch.

2.2.3 Verteilung der Einbauaktivitäten von dTR bzw. dUR und die statistische Berechnung derselben.

Um einen genaueren Überblick der Einbauaktivitäten von dTR bzw. dUR zu gewinnen, wurden die nach Anwendung der beiden Methoden ermittelten Zählergebnisse getrennt aufgetragen. Die Werte der Einbauaktivitäten beziehen sich auf die Gesamtzellzahl, den Anteil proliferierender Zellen und den Anteil der Blasten.

Es ergaben sich folgende Verteilungen:

Abb. 20

Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die KM-Zellen,bezogen auf die Gruppe der Patienten mit akuter Leukämie:

links : Werte nach Anwendung der Methode I

rechts : Werte nach Anwendung der Methode II

durchgezogene Linie = Mittelwert

gestrichelte Linie = Standardabweichung

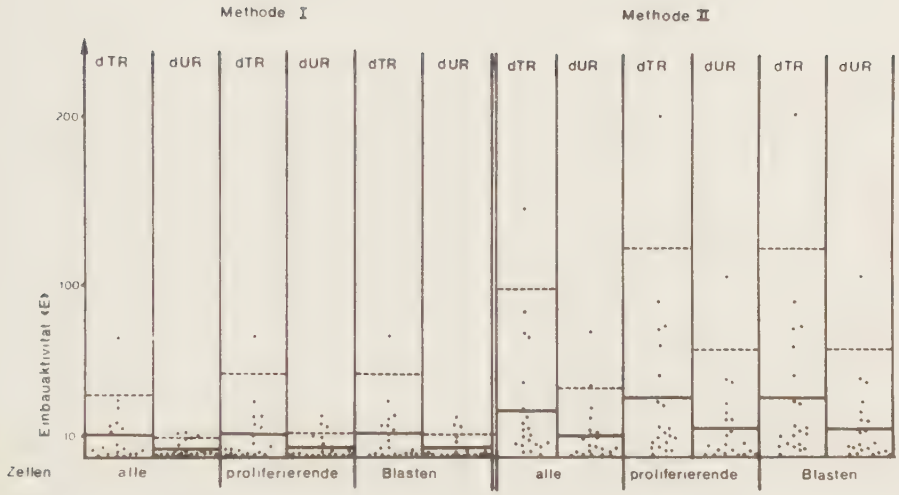


Abb. 21
Einbauaktivitäten von dTR und dUR in periphere Blutzellen, bezogen auf die Gruppe der Patienten mit akuter Leukämie.
Weitere Erläuterungen wie in Abb. 20, S. 50.

Abb. 22

Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die KM-Zellen, bezogen auf die Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen. Die auftretenden Erkrankungen sind unter III.-5., S. 23, aufgeführt.

Weitere Erläuterungen wie in Abb. 20, S.50.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in den Abbildungen berücksichtigt. Ihre Berechnung und die der übrigen statistischen Werte finden sich im Anhang unter Tab.$_A$ 15 - 26, S. 91 - 96.

Aus Abbildung 20 - 22 geht hervor:
Bezieht man sich unter Berücksichtigung der Patienten mit akut leukämischen Erkrankungen auf die Gesamtzahl der KM-Zellen (Abb. 20, S.50), wird deutlich, daß bei Verwendung von Methode I die Einbauaktivitäten von dTR und dUR im Bereich von 0E - 40E, bei Verwendung von Methode II im Bereich von etwa 0E - 120E liegen.
Unter Berücksichtigung des proliferierenden Anteils der KM-Zellen vergrößert sich dieser Bereich für die nach der Methode I angefertigten Zellen auf etwa 120 E (nur ein dUR-Wert liegt bei 193E), für die nach Methode II angefertigten Zellen auf etwa 330E.
Bezieht man die Einbauaktivitäten auf die Anzahl der Blasten liegt der Großteil der Werte in dem Bereich des proliferierenden Anteils der KM-Zellen, während einige Werte in einem weitaus höheren Bereich zu finden sind. Dieses trifft besonders für Methode I zu (Werte größer 2000 E, Tab.$_A$ 23, 24, S.95). Dadurch kommen höhere Mittelwerte und Standardabweichungen zustande. Da man davon ausgehen kann, daß diese Extremwerte falsch sind - in den Präparaten ist nämlich noch ein signifikanter Anteil anderer proliferierender Zellen zu finden - kann man bei den Methoden die Extremwerte vernachlässigen und erhält für die statistische Berechnung folgende Ergebnisse (vgl.Tab.$_A$23,24, S. 95 ,Abb.20, S.50).

	Methode I		Methode II	
	dTR	dUR	dTR	dUR
$\bar{x}$	76.3	51.2	146.6	113.4
s	107.5	87.3	146.7	143.6

Tab. 6
Mittelwerte und Standardabweichungen der Einbauaktivitäten der KM-Zellen von Patienten mit akuten Leukämien, bei Vernachläßigung der Extremwerte, bezogen auf den Anteil Blasten.

Bezieht man sich auf die Gesamtheit der PBL-Zellen von Patienten mit akut leukämischen Erkrankungen (vgl.Abb.21, S.51) wird deutlich, daß bei Anwendung von Methode I die Einbauaktivitäten im Bereich bis etwa 40 E für dTR (ein Wert bei 65 E) und bis 20 E für dUR liegen. Unter Verwendung von Methode II finden sich Werte bis 90 E für dTR (ein Wert bei 144 E) und bis 80 E für dUR. Besonders bei Methode I nehmen die dUR-Werte häufig den Wert Null an.
Berücksichtigt man nun den Anteil proliferierender Zellen ergibt sich bei beiden Methoden nur ein geringer Anstieg der Einbauaktivitäten. Die Ergebnisse bezüglich des Anteils der Blasten sind mit denen der proliferierenden Zellen identisch.

In der Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen (vgl.Abb.22, S.52) finden sich bezogen auf alle KM-Zellen bei Methode I Einbauaktivitäten bis zu 100 E (dTR) bzw. 30 E (dUR). Für Methode II liegen die entsprechenden Werte bei 330 E (dTR) bzw. 120 E (dUR).
Bei Berücksichtigung des proliferierenden Anteils der Zellen ergeben sich für beide Methoden deutlich höhere Werte.

2.3 Sonderfälle

2.3.1 Patienten

Bei drei Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen liegen - bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen - die Einbauaktivitäten nach Anwendung der Methode II besonders hoch. Die entsprechenden Werte, der nach der Methode I behandelten Zellen, befinden sich bis auf einen Fall, der nicht differenziert werden konnte, dagegen im Normalbereich.

Es handelt sich um folgende Patienten:

Fall I:
H.CH., weibl, geb. 5.10.1911
Diagnose: perniciöse Anämie
KM-Ausstrich: 13.3.1979

Die Zellausstriche ergaben:
Methode I: In beiden Präparaten nur sehr wenig Zellen, die nahezu alle zerstört waren. Eine Differenzierung war nicht möglich, weswegen keine Angaben über die Einbauaktivitäten bezüglich des proliferierenden Zellanteils gemacht werden können.

Methode II: In beiden Präparaten liegen jeweils 2% zerstörte Zellen vor. Präparat a war zellarm, die Zellen boten basophile Tüpfelung und Jollykörperchen.

Anteil proliferierender Zellen:
Methode I : nicht bestimmbar
Methode II : 16%

	Methode I	Methode II	Zellen
dTR	28.6	330.6	alle
dUR	26.3	72.3	
dTR	-	2289.7	proliferi-
dUR	-	501.0	rende

Tab. 7
Einbauraten der nach der Methode I bzw. Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf alle Zellen und den proliferierenden Anteil; Fall I.

Fall II:
Dieselbe Patienten wie Fall I.
KM-Ausstrich: 16.3.1979

Die Zellausstriche ergaben:

Methode I : In beiden Präparaten nur wenig Zellen, 93% davon zerstört. Präparat a war nicht auszählbar, in Präparat b wurden 50 Zellen ausgezählt.

Methode II : In beiden Präparaten jeweils 2% zerstörte Zellen, gut differenzierbar.

Anteil proliferierender Zellen:

Methode I : 52%

Methode II : 22%

	Methode I	Methode II	Zellen
dTR	34.2	66.4	alle
dUR	10.4	20.0	
dTR	221.3	1008.1	proliferie-
dUR	120.4	548.5	rende

Tab. 8
Einbauraten der nach der Methode I bzw. Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf alle Zellen und den proliferierenden Anteil; Fall II.

Fall III:

M.J.-J., männl., geb.1.1.1958
Diagnose: megaloblastäre Umwandlung des KM, Verdacht auf aplastische Anämie
KM-Ausstrich: 9.5.1979

Die Zellausstriche ergaben:

Methode I : Präparat a 70% zerstörte Zellen, nur 50 Zellen konnten ausgezählt werden.
Präparat b 50% zerstörte Zellen, gut differenzierbar.

Methode II : In den Präparaten kommen nur vereinzelt zerstörte Zellen vor.

Anteil proliferierender Zellen:
Methode I : 45%
Methode II : 20%

	Methode I	Methode II	Zellen
dTR	12.8	28.9	alle
dUR	16.6	37.4	
dTR	123.1	616.9	proliferie-
dUR	85.5	428.8	rende

Tab. 9
Einbauraten der nach der Methode I bzw. Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf alle Zellen und den proliferierenden Anteil; Fall III.

2.3.2 Meßergebnisse der Stoffwechselaktivitäten von dTR und dUR nach Korrektur der Extremwerte der Sonderfälle.

Die in 2.3.1, S.55, angegebenen Meßergebnisse der Stoffwechselaktivitäten sind bei den bisherigen Berechnungen berücksichtigt worden (vgl.IV,-2.2, S.37). Schließt man die Ergebnisse der Fälle I - III von der Berechnung der statistischen Werte der Stoffwechselaktivitäten aus, ergeben sich für die Einbauaktivitäten von dTR und dUR folgende Werte:

(Da Fall I - III zur Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen gehören, wurden nur Gesamtzellzahl und Anteil proliferierender Zellen berücksichtigt).

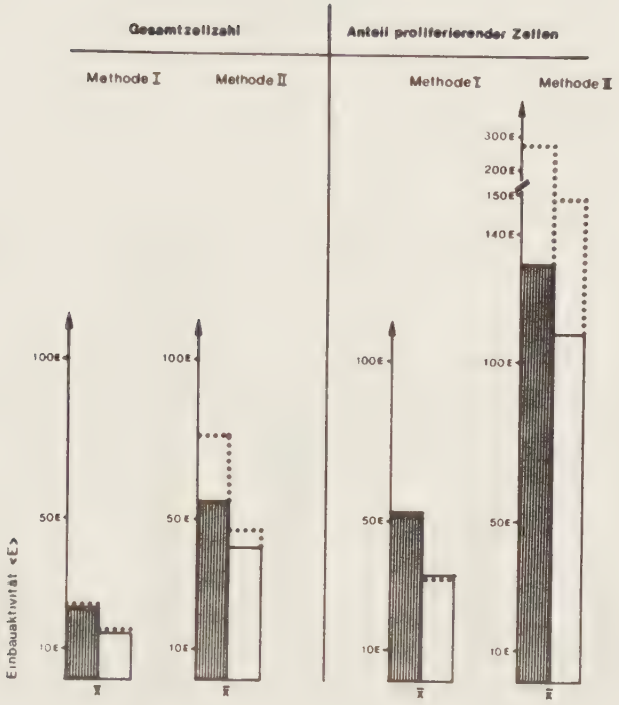


Abb.23

Mittelwerte der Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode I bzw. Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf alle Patienten mit Ausnahme von Fall I - III.

Gestrichelte Linie: Mittelwerte bei Berücksichtigung von Fall I - III.

: dTR : dUR

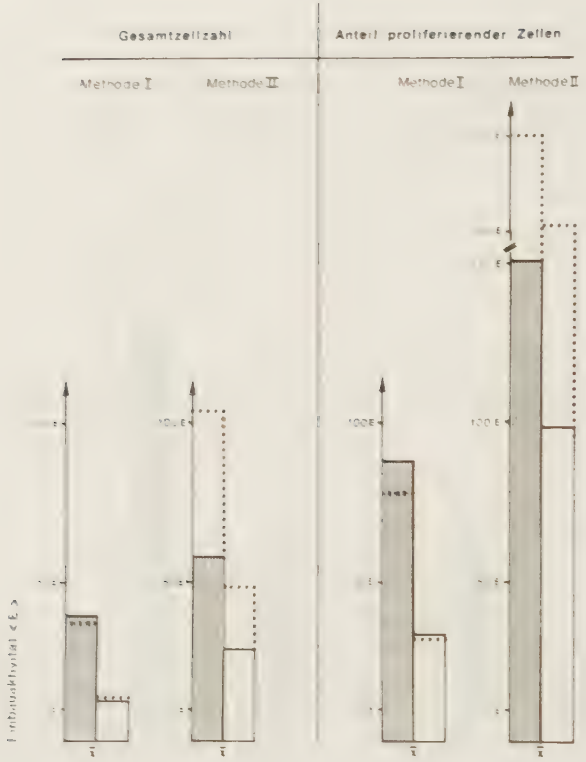


Abb. 24

Mittelwerte der Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode I (Methode II) behandelten KM-Zellen, bezogen auf die Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen mit Ausnahme von Fall I - III.

Zeichenerklärung wie in Abb. 23.

Die statistischen Werte zu Abb. 23,24 finden sich im Anhang unter Tab. A 27 - 30, S. 97 - 98.

Bei allen drei Sonderfällen bestand während der Auszählung die Schwierigkeit, bestimmte Zellen der Gruppe der Erythroblasten oder Normoblasten zuzuordnen (vgl.IV.-1.3.2, S.31 - 33). Das trifft insbesondere für die nach der Methode II angefertigten Zellausstriche zu. Hier finden sich auch bei der Berechnung der statistischen Werte für die Einbauaktivitäten bezüglich des Anteils proliferierender Zellen die größten Unterschiede, wie Abb. 23, S.59 und Abb. 24, S.60 zeigen.

Zählt man nun den Anteil der Normoblasten zu dem der Erythroblasten und damit zu den proliferierenden Zellen, ergeben sich für die Einbauaktivitäten folgende Werte:

Fall	Normoblasten	Eryhtroblasten + Normoblasten	Methode II dTR	dUR
I	26 %	42 %	787.1 (2289.7)	172.1 (501)
II	46 %	68 %	325.5 (1008.1)	177.1 (548.5)
III	21 %	41 %	300.2 (616.9)	208.6 (428.8)

Tab. 10
Einbauaktivitäten von dTR und dUR, der nach der Methode II behandelten Zellen der Fälle I - III, bezogen auf den proliferierenden Anteil der Zellen unter Hinzunahme der Normoblasten. Die in Klammern stehenden Werte geben die Einbauaktivitäten ohne Berücksichtigung der Normoblasten an.

Die Veränderungen der Einbauaktivitäten bei den nach der Methode I behandelten Zellen wurden nicht berücksichtigt, da in diesen Präparaten kaum Erythroblasten bzw. Normoblasten vorhanden waren (vgl. IV.-1.3.2, S.31 -33), und sich das Einbauaktivitätsergebnis somit nicht wesentlich verändert hätte. Zudem liegen keine großen Unterschiede bezüglich der Einbauaktivitäten mit bzw. ohne Fall I - III vor (vgl. Abb. 23,24, S. 59, 60).

Aufgrund der erheblichen Unterschiede der Einbauaktivitäten der nach der Methode II behandelten Zellen, wurden die entsprechenden Zellbilder ein zweites Mal mikroskopiert, wobei die "Zweifelsfälle" unter den Normoblasten jeweils der Gruppe der Eryhtroblasten zugeordnet wurden.
Es ergaben sich folgende Werte für die Einbauaktivitäten und den Anteil proliferierender Zellen:

Fall	Anteil proliferierender Zellen	dTR	dUR
I	34 %	972.3	212.8
II	31 %	714.0	388.4
III	36 %	341.8	237.6

Tab. 11
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode II behandelten KM-Zellen der Fälle I - III, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen nach erneuter Differenzierung der Präparate.

Methode II

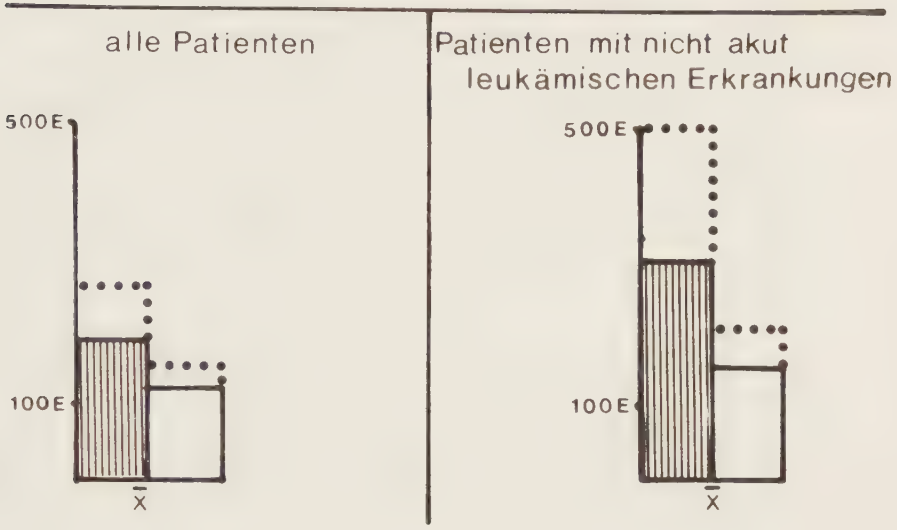


Abb. 25

Mittelwerte der Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf alle Patienten (links) und auf Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen (rechts) nach erneuter Differenzierung der Zellausstriche. Es wurde der Anteil proliferierender Zellen berücksichtigt.

Gestrichelte Linie: Mittelwerte vor Korrektur der Fälle I - III.

: dTR : dUR

Die statistischen Werte zu Abb. 25 finden sich in Tab.$_A$ 31, S. 99.

Aus Abbildung 23 - 25 geht hervor:

Vergleicht man die Einbauaktivitäten aller Patienten, fällt bei Methode I auf, daß sowohl unter Berücksichtigung der Gesamtzellzahl als auch des Anteils proliferierender Zellen bei den Mittelwerten mit und ohne Fall I - III kaum ein Unterschied besteht. Bei Anwendung der Methode II hingegen tritt bei der Gesamtzellzahl und besonders deutlich bei den proliferierenden Zellen ein Unterschied hervor. Wird Fall I - III nicht berücksichtigt, liegen die Mittelwerte der Einbauaktivitäten bedeutend niedriger (vgl.Abb. 23, S.59).

Bezieht man sich nur auf die Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen, tritt dieser Unterschied noch deutlicher als bei Berücksichtigung aller Patienten hervor. Methode I weist kaum Unterschiede auf. Zum Teil liegen die Mittelwerte der Einbauaktivitäten mit Fall I - III sogar niedriger als ohne dieselben (vgl. Abb. 24, S.60).

Nach Korrektur von Fall I - III liegen - bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen - die Mittelwerte der Einbauaktivitäten bei der Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen um ca. 120 E für dTR und ca. 30 E für dUR höher als bei Berücksichtigung aller Patienten (vgl. Abb.25, S.63).

3. DNS-Stoffwechselaktivitätsbestimmungen bei Patienten mit perniciöser Anämie.

3.1 Patienten

Bezüglich der Diagnose perniciöser Anämie wurden vier Fälle näher untersucht.

Fall 1:
H.Ch., weibl., geb. 5.10.1911
KM-Ausstrich: 13.3.1979

Fall 2:
diesselbe Patientin wie unter Fall 1
KM-Ausstrich: 16.3.1979

Fall 3:
B.M., weibl., geb. 25.9.1931
KM-Ausstrich: 9.11.1979

Fall 4:
O.G., männl., geb. 13.11.1926
KM-Ausstrich:15.11.1979

3.2 Ergebnisse der Zellzählung

Bei der Zelldifferenzierung der Präparate fiel auf, daß die nach der Methode I angefertigten Ausstriche wegen der geringen Anzahl und starken Zerstörung der Zellen wesentlich schwieriger zu beurteilen waren, als die nach der Methode II angefertigten Ausstriche (vgl.IV.-1.3, S.31).

Besonders deutlich trat der Unterschied zwischen den beiden Methoden bezüglich der Anzahl der Erythroblasten und Normoblasten hervor.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Zählergebnisse:

	Erythroblasten		Normoblasten	
Methode	I	II	I	II
Fall 1	- (-)	26 (6)	- (-)	29 (26)
Fall 2	2 (4)	27 (14)	- (-)	33 (46)
Fall 3	-	6	-	5
Fall 4	-	11	-	31

Tab. 12
Anzahl der Erythroblasten bzw. Normoblasten bei den nach der Methode I bzw. Methode II behandelten Zellausstriche.

Fall 1 und 2 gehören zu den unter IV. - 2.3, S.55 besprochenen Sonderfällen. Die Anzahl der Erythroblasten bzw. Normoblasten, die bei der ersten Durchsicht der Präparate ermittelt wurde, ist in Klammern hinzugefügt (vgl. Tab.5, S.33).

3.3 Ergebnisse der DNS-Stoffwechselaktivitätsbestimmung

Die Einbauaktivitätsverteilung der Fälle 1 - 4 gibt Abb. 26 wieder.

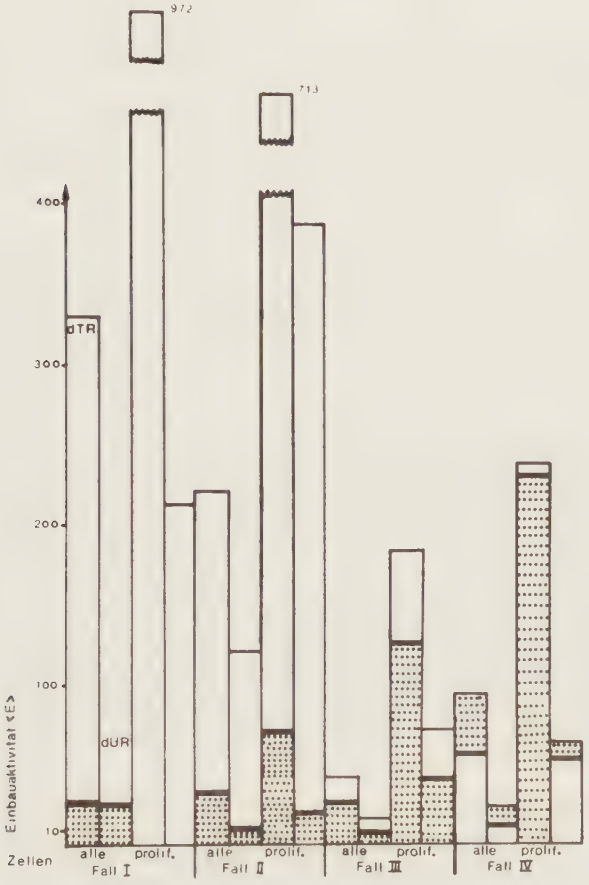


Abb. 26

Einbauaktivität des radioaktiven Thymidins bzw. Deoxiuridins der nach der Methode I bzw. Methode II behandelten KM-Zellen der Patienten mit perniciöser Anämie. Die Aktivitätsmessung bezieht sich einmal auf die Gesamtzellzahl, zum Anderen auf den proliferierenden Anteil der Zellen.

: Methode I

: Methode II

Für den Quotienten dUR/dTR (vgl. S.6,7) ergaben sich folgende Werte:

	alle Zellen		proliferierende Zellen	
Methode	I	II	I	II
Fall 1	0.92	0.22	-	0.22
Fall 2	0.30	0.54	0.30	0.54
Fall 3	0.30	0.38	0.33	0.40
Fall 4	0.28	0.23	0.28	0.23

Tab. 13
Quotient dUR/dTR der Einbauaktivitäten der nach der Methode I bzw. Methode II behandelten KM-Zellen der Patienten mit perniciöser Anämie,bezogen auf die Gesamtzellzahl und den proliferierenden Anteil derselben.

Im Fall 1 liegt für den Anteil proliferierender Zellen bezüglich der Methode I kein Wert vor, da hier sowohl bei Präparat a, als auch Präparat b wegen der äußerst wenigen und zudem zerstörten Zellen eine Auszählung unmöglich war.

Aus Abb. 26 geht hervor:

Bei Fall 1 - 3 liegen die Einbauaktivitäten von dTR und dUR bei Anwendung der Methode II sowohl bei allen Zellen, als auch unter Berücksichtigung des proliferierenden Anteils der Zellen deutlich höher als bei Benutzung von Methode I. Besonders fällt dieses bei Fall 1 und 2 auf, da hier mit Methode II im Vergleich zu Methode I bis zu 80-fach höhere Einbauaktivitäten erreicht werden.

In allen drei Fällen tritt der Unterschied bezüglich der Einbauaktivitäten besonders deutlich bei Berücksichtigung des Anteils proliferierender Zellen hervor.

Fall 4 weist bei Berücksichtigung aller Zellen sowohl für den Einbau von dTR, als auch dUR, höhere Einbauaktivitäten unter Verwendung der Methode I auf. Bei den proliferierenden Zellen trifft dieses nur für dUR zu. Die Differenzen der Einbauaktivitäten sind gering (ca. 8 - 35 E).

Aus Tabelle 13 geht hervor:
Im Fall 3 und 4 ist sowohl bei Berücksichtigung aller Zellen, als auch des proliferierenden Anteils, kaum ein Unterschied zwischen den Quotienten der nach der Methode I bzw. Methode II angefertigten Zellsuspensionen zu sehen. Bei Fall 2 liegt der Quotient für Methode II um 0.24 höher als für Methode I, so daß hier ein Unterschied in der Stoffwechselaktivität der unterschiedlich aufbereiteten Zellsuspensionen angenommen werden kann. Auffällig ist das Ergebnis bei Fall 1, wo der Quotient für Methode I um 0.7 höher liegt als für Methode II. Da sich der Quotient deutlich von den übrigen Quotienten, der nach der Methode I angefertigten Zellsuspensionen abhebt (Differenz: 0.62 - 0.64), läßt sich vermuten, daß es sich in diesem Fall um einen durch die Aufbereitung herbeigeführten Fehler (kaum Zellen im Ausstrich!) in der Einbauaktivitätsmessung handelt.

4. DNS-Stoffwechselaktivitätsbestimmung während Methotrexatbehandlung bei Patienten mit akuter Leukämie.

4.1 Patienten

Fall A:
K.T., männl., geb. 18.9.1961
PBL-Ausstriche: 23.,25.,28.,30.,31.5.1979, 1.6.1979

Fall B:
M.E., männl., geb. 18.10.1961
PBL-Ausstriche: 5.,6.,8.,9.,12.,14.,15.,16.,19.,21.,22.,23. und 26.2.1979

Beide Patienten erhielten im Rahmen einer ALL Methotrexat. Dieses wurde wie folgt verabreicht:

Fall A:

22./23. Mai 1979	800 mg MTX über 24 Stunden
30./31. Mai 1979	800 mg MTX über 24 Stunden

Fall B:

05./06. Februar 1979	1 g MTX/2 Stunden
13./14. Februar 1979	1 g MTX/2 Stunden
20./21. Februar 1979	500 mg MTX/2 Stunden

4.2 Ergebnisse der DNS-Stoffwechselaktivitätsbestimmung

Wie aus IV.-2.2.2, S. 41 und 2.2.3, S. 49 hervorgeht, liefern bei Krankheitsbildern, in denen vornehmlich Blasten auftreten, Methode I und II zuverlässige Ergebnisse. Deshalb wurden zur Beurteilung der Verlaufsform nur die Ergebnisse, der nach der Methode II angefertigten Präparate herangezogen.
Ebenso fanden nur die Einbauaktivitäten des Anteils proliferierender Zellen Verwendung, da nur diese Zellen radioaktives Material einbauen können und die MTX-Wirkung sich nur an proliferierenden Zellen auswirken kann.

Die Verteilung der Einbauaktivitäten von dTR und dUR sind in Abb. 27 bzw. Abb. 29 dargestellt. Die Verläufe der Quotienten dUR/dTR finden sich in Abb. 28 bzw. Abb. 30.

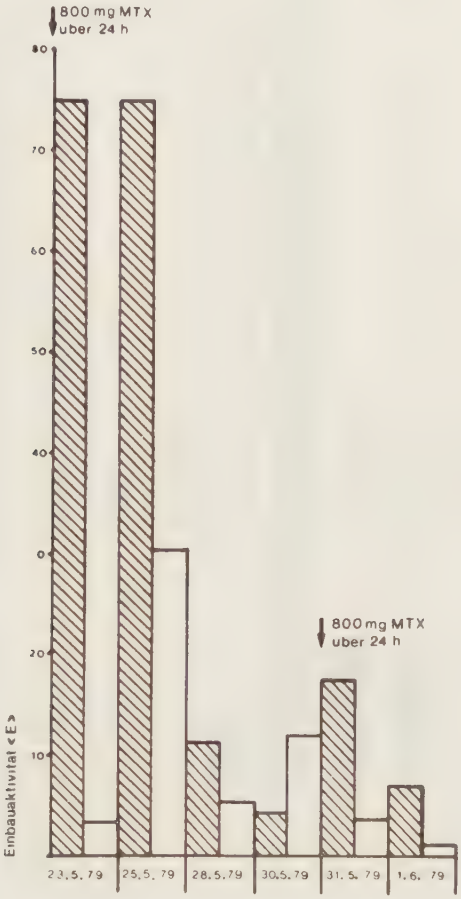


Abb. 27

Einbauaktivitäten von dTR und dUR unter MTX-Gabe in der Zeit vom 23.5.1979 - 1.6.1979; nach Methode II angefertigte Präparate von Fall A. Berücksichtigt wurde der Anteil proliferierender Zellen.

: dTR : dUR

Abb. 28
Quotient dUR/dTR der Einbauaktivitäten bei Fall A.

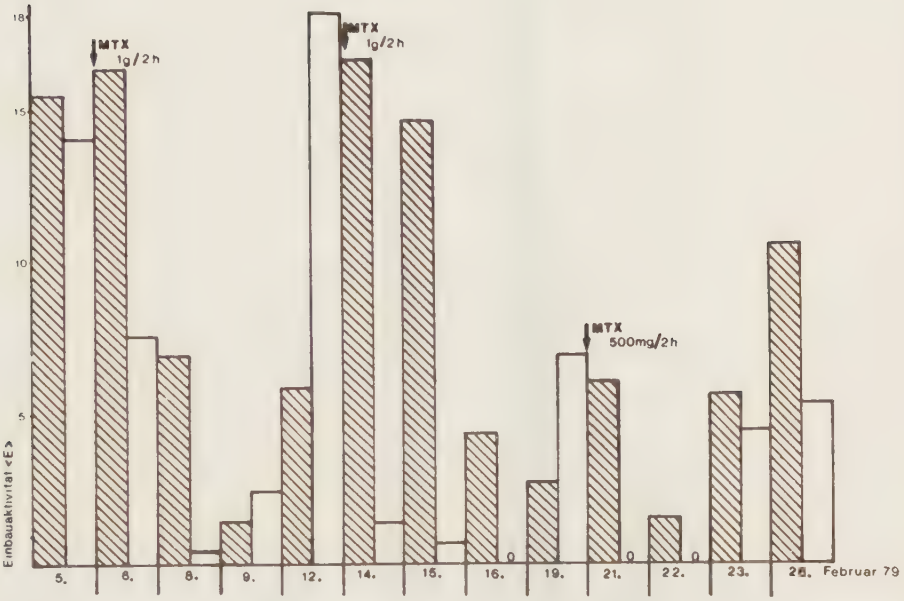


Abb. 29
Einbauaktivitäten von dTR und dUR unter MTX-Gabe in der Zeit vom 5.2.1979 - 26.2.1979; nach Methode II angefertigte Präparate von Fall B. Berücksichtigt wurde der Anteil proliferierender Zellen.

: dTR : dUR

Abb. 30
Quotient dUR/dTR der Einbauaktivitäten bei Fall B.

Aus Abb. 27 - 39 geht hervor:
Nach MTX-Gabe fallen zunächst die Werte für dUR ab (vgl.Abb.27 u. 29), was von einem entsprechend niedrigen Quotienten dUR/dTR (vgl.Abb.28 u.30) begleitet wird. Danach fallen auch die dTR-Werte ab, während die dUR-Werte wieder ansteigen. Der Quotient dUR/dTR nimmt entsprechend zu. Wird wieder MTX gegeben steigen die dTR-Werte weiter an, während die dUR-Werte stark abfallen; der Quotient dUR/dTR nimmt wieder entsprechend ab.

V.Diskussion

Zur Beantwortung der Frage nach der Abhängigkeit des Einbaus von ^{3}H-dTR und ^{3}H-dUR vom Anteil proliferierender Zellen in unterschiedlich bearbeiteten Zellsuspensionen wurden Ausstrichpräparate dieser Zellsuspensionen differenziert.
Es ergaben sich folgende Resultate:
Bezüglich der KM-Ausstriche, die von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen stammen, muß zwischen einer Gruppe mit akut leukämischen und einer Gruppe mit nicht akut leukämischen Erkrankungen unterschieden werden (vgl.Abb. 5 - 7, S.27,28, Tab.$_A$1,2,3, S. 84 u. 85.)
Die Zellausstriche der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen weisen durchschnittlich 20 % weniger proliferierende Zellen auf, als die der Patienten mit akut leukämischen Erkrankungen (vgl.Abb. 6,7, S.27,28, Tab.$_A$2,3, S.84,85). Dieses trifft für das unbearbeitete, isolierte und defibrinierte KM zu.
Weiterhin zeigt sich erst nach Gruppenunterteilung ein Unterschied zwischen den drei Methoden der Zellaufbereitung (unbearbeitetes, isoliertes, defibriniertes KM). Während bei der Gruppe mit akut leukämischen Erkrankungen bezüglich des Anteils proliferierender Zellen kein bemerkenswerter Unterschied auftritt (vgl.Abb.6, S.27, Tab.$_A$2, S. 84), fällt dieser doch sehr deutlich bei der Gruppe mit nicht akut leukämischen Erkrankungen auf (vgl. Abb.7, S.28, Tab.$_A$ 3, S. 85). Hier liegt der Anteil proliferierender Zellen nach Anwendung der Methode I (isoliertes KM) um etwa 20% höher als nach Anwendung der Methode II (defebriniertes KM), die Werte für das unbearbeitete KM liegen zwischen denen von Methode I und II (vgl.Abb. 6,7, S.27,28, Tab.$_A$ 3,4, S. 85). Schon hier stellt sich die noch an späterer Stelle zu erörternde Frage, ob der erhöhte Anteil proliferierender Zellen bei Methode I auf die größere Elimination der nicht proliferierenden Zellen zurückzuführen ist. Interessanterweise beträgt nämlich der Unterschied Methode I - Methode II bei den leukämischen Zellen, die zum großen Teil Blasten und damit proliferierende Zellen sind, nur etwa 8% (vgl.Abb.6, S.27, Tab.$_A$2, S. 84). Offensichtlich werden also bei der Methode I nicht nur die Erythrocyten, sondern auch andere ausgereifte Zellen abgetrennt.

Auch bei den peripheren Blutzellen, die nur von Patienten mit akut leukämischen Erkrankungen stammen, liegt bezüglich des Anteils proliferierender Zellen der Wert für Methode I (ca. 89% proliferierende Zellen) nur um etwa 4% höher als der Wert für Methode II (ca. 85% proliferierende Zellen). Im Vergleich zum unbearbeiteten PBL (72% proliferierende Zellen) finden sich aber sowohl für das isolierte als auch defibrinierte PBL deutliche Unterschiede in der Anzahl der proliferierenden Zellen. So ergeben sich für Methode I etwa 17%, für Methode II etwa 13% mehr proliferierende Zellen (vgl.Abb.8, S.29, Tab.$_A$4, S.85).

Bezüglich der Blasten ergibt sich bei den KM-Ausstrichen zwischen Methode I (51% Blasten) und Methode II (53% Blasten) kaum ein Unterschied, während die Werte für das unbearbeitete KM (ca.65% Blasten) um 14% (Methode I) bzw. 12% (Methode II) höher liegen (vgl.Abb.9, S.30, Tab.$_A$ 5, S. 86).

Bei den Zellen des peripheren Blutes ergeben sich für den Anteil Blasten nahezu dieselben Werte wie für den Anteil proliferierender Zellen (vgl.Abb.8,10, S.29,30, Tab.$_A$ 4,6, S.85,86).Damit wird deutlich, daß bei den PBL-Zellen der Anteil proliferierender Zellen nahezu vollständig aus Blasten besteht, während bei den KM-Zellen die Blasten nur einen Teil der proliferierenden Zellen ausmachen (vgl.Abb.6,9,S.27,30, Tab.$_A$ 2,5 S.84,86). Beim unbearbeiteten KM (ca. 64% Blasten und 65% proliferierende Zellen) ist der Anteil proliferierender Zellen ungefähr gleich dem Anteil der Blasten (vgl.Abb.8,9,S.29,30, Tab.$_A$2,5, S.84,86).

Während der Zelldifferenzierung fiel die unterschiedliche Qualität der nach der Methode I bzw. Methode II angefertigten Zellsuspensionen auf.
Sowohl die Zellen des KM als auch die des PBL weisen nach Anwendung der Methode I einen erheblich größeren Zerstörungsgrad auf, als nach Anwendung der Methode II.

In der Gruppe der Patienten mit akut leukämischen Erkrankungen findet sich bei den KM-Zellen der AML ein Zerstörungsgrad von 80% (Methode I) bzw. 3% (Methode II), bei der ALL ein Zerstörungsgrad von 50% (Methode I) bzw. 5% (Methode II).
Bei den PBL-Zellen ergeben sich für die AML Werte von 87% (Methode I) bzw. 3% (Methode II), für die ALL Werte von 86% (Methode I) bzw. 9% (Methode II) (vgl.Tab.3, S.31, Abb.11 a - d, S.34,35).
Für die KM-Zellen der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen ergibt sich ein Zerstörungsgrad von 20 % - ca.100 % (Methode I) bzw. 2 % - 18 % (Methode II)(vgl.Tab.4, S.32,33).

Es muß allerdings beachtet werden, daß bei den Zellausstrichen von Patienten mit akut leukämischen Erkrankungen primär hauptsächlich Blasten vorliegen, so daß der Zerstörungsgrad der Zellen hier keinen wesentlichen Einfluß auf die relative Zusammensetzung der Zellpopulationen nimmt. Anders ist es in gemischten Zellpopulationen, wie sie in der Gruppe der nicht akut leukämischen Erkrankungen zu finden sind. Das Vorhandensein von Zellen aller morphologischen Klassen erfordert eine genaue Differenzierung. Auf Grund der geringen Zellzahl und des hohen Zerstörungsgrades der Zellen (vgl.Tab.4, S.32,33) war dieses bei den nach der Methode I angefertigten Zellausstrichen aber oft unmöglich bzw. eine eindeutige Zuordnung der Zellen zu morphologischen Klassen sehr schwierig. Wegen dieser Ungenauigkeiten stellt sich die Frage, inwieweit es angebracht ist, die Methode I bei der Aufbereitung der nicht leukämischen KM-Zellen zu verwenden. Da diese Probleme der Zelldifferenzierung bei Anwendung der Methode II nicht auftreten, kann der Zerstörungsgrad der KM-Zellen bei Anwendung der Methode I auf die wesentlich aggressivere Aufbereitung derselben zurückgeführt werden. Die Verwendung von Ammoniumchlorid (vgl.III.-2.2, S.12) scheint dabei eine wesentliche Rolle zu spielen. So kamen auch H.Bolland und Mitarbeiter zu dem Ergebnis, daß die Lebensdauer von Granulocyten nach Isolierung mit Ammoniumchlorid verkürzt wird (3).

Für eine methodisch bedingte Zerstörung bestimmter Subpopulationen bei der Isolierung von KM-Zellen spricht auch der unterschiedliche Anteil der Erythroblasten und Normoblasten bezüglich der beiden Methoden bei Patienten mit perniciöser Anämie. So beträgt für die Erythroblasten der prozentuale Anteil 0,75% (Methode I) bzw. 12,63% (Methode II), für die Normoblasten 0% (Methode I) bzw. 21,25% (Methode II) (vgl. Tab.5, S.33). Auf dieses spezielles Problem wird bei der Besprechung der Fälle mit perniciöser Anämie nochmals eingegangen werden.

Beim Vergleich der Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode I bzw. Methode II behandelten Zellen stellten sich folgende Ergebnisse heraus:
Für die Einbauaktivitäten von dTR und dUR läßt sich auch nach Berücksichtigung des Anteils proliferierender Zellen kein linearer mathematischer Begriff zwischen der Methode I und II ermitteln (vgl. Abb.12,13, S.38,40). Im Mittel liegen die Werte mit Methode II aber höher als mit Methode I; d.h. daß bei Methode I die übrigbleibenden proliferierenden Zellen geschädigt sind und eine verminderte DNS-Stoffwechselaktivität besitzen.
Die Einbauaktivitäten nach Anwendung der Methode II liegen insbesondere bei Berücksichtigung des Anteils proliferierender Zellen bezogen auf die KM-Zellen nahezu doppelt so hoch, wie nach Anwendung der Methode I (vgl. Abb.14 - 16, S. 41 - 45, Tab.$_A$ 7 - 12, S.87 - 89, Abb. 20,21, S.50,51, Tab.$_A$ 15,16,19,20, S. 91,92,93,94). Daraus folgt, daß mit Methode II genauere Ergebnisse der Einbauaktivitäten erzielt werden.

Die Einbaurate von dTR und dUR in die leukämischen KM-Zellen unterscheidet sich sowohl bezüglich der Verteilung der Einbauaktivitäten, als auch bezüglich deren Mittelwerte von den nicht leukämischen KM-Zellen (vgl. Abb.14 a - c, S.41 - 43, Tab.$_A$ 7,10, S.87,88, Abb. 20,21, S.50,51, Tab.$_A$ 15,16, S. 91,92). Die Einbauaktivitäten in die KM-Zellen liegen für beide Methoden bei der Gruppe der nicht akut leukämischen Zellen höher als bei den leukämischen Zellen, was besonders bei Berücksichtigung des proliferierenden Anteils der Zellen deutlich wird (vgl. Abb. 20,22, S.50,52, Tab.$_A$ 15,16,19,20, S. 91,92, 93,94).

Das bedeutet, daß die Proliferationsaktivität der leukämischen Zellpopulation bezogen auf die einzelne proliferierende Zelle geringer ist, als die normaler proliferierender Zellen.

Bezieht man bei der Gruppe der akut leukämischen Erkrankungen die Einbauraten auf den Anteil Blasten, finden sich bei beiden Methoden, insbesondere aber bei Methode I, Werte, die in Einzelfällen sogar 10-fach höher liegen, als die der proliferierenden Zellen. Da aber für beide Methoden in jeweils zwei Fällen nur wenig Blasten im Zellausstrich gefunden wurden, resultierten daraus entsprechend hohe Einbauaktivitäten (vgl.III.-4.1.2, 4.2.2, S. 20,22). Läßt man diese Extremwerte weg, erhält man Werte, die im Bereich der proliferierenden Zellen liegen (vgl.Tab.$_A$ 19,20, 23,24, S. 93 - 95, Abb. 20, S.50, Tab. 6, S.54). Daraus folgt, daß bei Berechnung der Einbauaktivitäten bezüglich der Blasten auf Außenseiter zu achten ist, um nicht falsche Ergebnisse zu erhalten.

Für die Einbauaktivitäten in die PBL-Zellen trifft im Wesentlichen dasselbe zu, wie für die KM-Zellen (vgl. Abb. 17,18, S.46, 47, Tab.$_A$ 13,14, S.90, Abb. 21, S.51, Tab.$_A$ 21,22,25,25, S. 94 - 96). Da der Anteil proliferierender Zellen dem der Blasten entspricht, sind die Einbauaktivitäten der proliferierenden Zellen und Blasten identisch (vgl. Abb. 18,19, S. 47, Tab.$_A$ 13,14, S. 90, Abb. 21, S. 51, Tab.$_A$ 13,14, S. 90).
Es muß allerdings beachtet werden, daß die PBL-Zellen bei beiden Methoden weniger dTR und dUR einbauen, als die KM-Zellen (vgl. Abb. 14 - 19, S. 41 - 47, Tab.$_A$ 7 - 14, S. 87 - 90, Abb. 20,21, S. 50,51, Tab.$_A$ 15 - 26, S. 91 - 96).
Zur genauen Feststellung radioaktiv speichender und damit proliferierender Zellen sollte daher ein Knochenmarkspunktat herangezogen werden. Bei den PBL-Zellen, die verhältnismäßig wenig radioaktives Material speichern, empfiehlt sich bei der Aufbereitung die Methode II, da mit ihr höhere Einbauaktivitätswerte erzielt werden, als mit Methode I.
Bei den nach der Methode II angefertigten KM-Ausstrichen von drei Patienten mit perniciöser Anämie (aus der Gruppe der nicht akut

leukämischen Erkrankungen) fielen Extremwerte bezüglich der Einbauraten auf (vgl. Tab.10,11,S. 61,62).
Dieses trifft nur für die nach der Methode II angefertigten Zellsuspensionen zu. Da bei Methode I keine Extremwerte vorlagen, kann auch keine Änderung bei Aussparung der Fälle I - III erwartet werden (vgl.Abb. 23,24, S.59,60, Tab.$_A$27 - 30, S. 97,98).
Bei den drei Fällen bestand während der Auszählung die Schwierigkeit, bestimmte Zellen der Gruppe der Erythroblasten oder Normoblasten zuzuordnen, was sich entsprechend auf den Anteil proliferierender Zellen auswirkte. Da sich beim Weglassen der Fälle I - III besonders beim Anteil proliferierender Zellen große Unterschiede der statistischen Werte der Einbauaktivitäten ergaben (vgl. Abb.23,24,S.59,60, Tab.$_A$ 28,29 S.97, 98) wurden die Präparate der drei Fälle erneut differenziert. Das Ergebnis bietet Werte, die weit unter den vorherigen Extremwerten liegen (Tab. 11, S.62, Abb. 25, S.63, Tab.$_A$ 31, S. 99).
Aus diesem Problem ergibt sich, daß eine genaue Kenntnis der Zellmorphologie notwendig ist, um eine relevante Aussage über die Präparate machen zu können.
Präparate, bei denen wegen starker Verschmutzung oder Zerstörung - wie es häufig bei den nach der Methode I angefertigten KM -und PBL-Ausstrichen vorkommt (vgl.IV.-1.3, S.31) - eine genaue Differenzierung unmöglich ist, müssen Zählfehler einkalkuliert werden. Solche Zählfehler wirken sich aber entscheidend auf die Berechnung der Einbauaktivitäten und damit auf die Prognose und Behandlungsweise des jeweiligen Patienten aus.

In der Gruppe der Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen fiel bei den Patienten mit perniciöser Anämie auf, daß die nach der Methode I behandelten Zellen in einem erheblich größeren Maße zerstört und zudem in einer weitaus geringeren Anzahl vorlagen als die nach der Methode II behandelten Fälle (vgl.Tab. 4, S.32,33). Das trifft insbesondere für die Anzahl der Erythroblasten und Normoblasten zu (vgl.Tab. 5,10, S. 33,61).

Die Auswirkung dieser Tatsache auf den Anteil proliferierender Zellen und damit auf die Höhe der Einbauaktivitäten wurde schon angesprochen. Hinzu kommt, daß die Verteilung von dTR und dUR, angegeben durch den dUR/dTR-Quotienten, beim nach der Methode I aufbereiteten KM der Patienten mit perniciöser Anämie z.T.gut, z.T.überhaupt nicht wiedergegeben wird (vgl.Abb. 26, S. 67). Besonders deutlich wird dieses im Quotienten dUR/dTR (vgl.Tab. 13, S.68).
Das bedeutet, daß man bei den nach der Methode I angefertigten Präparaten keine sicheren Aussagen über deren Zellzusammensetzung und damit DNS-Stoffwechselaktivität machen kann. Bei den nach der Methode II angefertigten KM-Ausstrichen treten diese Probleme nicht auf (vgl. Tab.5,12,13, S.33,66,68, Abb.26,S.67).

Zur Verlaufskontrolle von Erkrankungen sollte die Methode II zur Anwendung kommen, da sie genauere Ergebnisse liefert. Die Inkubation erfolgt nämlich unter autologen Bedingungen, d.h. ohne vorheriges Waschen der Zellsuspension. Hierbei befinden sich die nicht alterierten Zellen im autologem Plasma unter den Bedingungen, die auch in vivo vorliegen. Medikamenten- oder Vitaminkonzentrationen, die sich auf die morphologische Zusammensetzung der Zellen auswirken, werden bei Methode II damit berücksichtigt. Dieses ist dagegen bei der aggressiveren Aufbreitung der Methode I nicht der Fall.
Außerdem sollte zur Verlaufskontrolle nur der Anteil proliferierender Zellen berücksichtigt werden, da nur diese Zellen radioaktives Material speichern.
Wie genau der Verlauf einer Erkrankung an Hand der DNS-Stoffwechseluntersuchungen beurteilt werden kann, zeigen zwei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie. Beide wurden mehrmals mit MTX behandelt. Die Einbauaktivitäten bzw. der Quotient dUR/dTR fielen zwei Tage nach MTX-Behandlung deutlich ab und stiegen in der Erholungsphase rasch wieder an (vgl. Abb. 27 - 30, S.71 - 74). Da diese Art der Verlaufskontrolle ein technisch einfaches und für den Patienten verhältnismäßig schmerzloses Verfahren darstellt, wäre es angebracht zu untersuchen, ob man andere Krankheitsbilder in ähnlicher Weise überprüfen kann.

VI. Zusammenfassung

Zytomorphologie und DNS-Stoffwechselaktivität wurden in verschieden bearbeiteten Zellsuspensionen von Knochenmark und peripherem Blut untersucht:

1. isolierte kernhaltige Zellen nach Abtrennung des Erythrocytenanteils (Methode I)

2. defibriniertes Knochenmark (KM) oder Blut (PBL) ohne weitere Zellisolierung (Methode II).

Bei Anwendung der Methode I treten wegen der aggressiveren Aufbereitung, die unter anderem Ammoniumchlorid verwendet, wesentlich größere Zellschädigung auf, als bei Methode II. Dieses trifft für die KM - als auch PBL - Zellen zu.

Da bei Methode II kaum Zellen zerstört werden, gibt diese Methode verläßlichere Werte über die Höhe der Einbauaktivitäten für die DNS-Vorstufen Thymidin (^{3}H-dTR) und Deoxiuridin (^{3}H-dUR) der Zellen als Methode I. Die Berechnung der Einbauaktivitäten sollte sich nur auf den proliferierenden Anteil der Zellen beziehen, da nur diese Zellen einen DNS-Stoffwechsel besitzen und radioaktives Material einbauen können.
Es ist erforderlich, die Zellpopulationen von Patienten mit akut leukämischen und nicht akut leukämischen Erkrankungen zu unterscheiden.
Bei den akut leukämischen Zellen liegen hauptsächlich homogene Blastenpopulationen vor, so daß eine größere Zellzerstörung keine entscheidende Auswirkung auf die morphologische Zusammensetzung der Zellausstriche hat. Hier könnte also Methode I Verwendung finden. Da aber bei den akut leukämischen KM-Zellen nach Anwendung von Methode I die übriggebliebenen proliferierenden Zellen geschädigt sind und eine verminderte DNS-Stoffwechselaktivität aufweisen, wäre zur Aufbereitung dieser Zellen Methode II nützlicher.

Bei den nicht akut leukämischen Zellpopulationen ist eine genaue Differenzierung der Zellausstriche notwendig, um die Einbauaktivitäten richtig berechnen zu können. Dazu müssen eine genaue morphologische Kenntnis der Zellen, sowie exakt angefertigte Präparate vorausgesetzt werden. Die Zellen der Erythropoese, die bei dem Krankheitsbild der perniciösen Anämie eine entscheidende Rolle spielen, werden durch Anwendung von Methode I nahezu vollständig zerstört, was sich entsprechend auf den Anteil proliferierender Zellen und damit auf die Höhe der Einbauaktivitäten auswirkt.
Für die Aufbereitung von Blut- und Knochenmarkproben, die von Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen stammen, ist die Methode I unbrauchbar, und es sollte zur Aufbereitung der Zellen nur Methode II verwendet werden.

Zur Verlaufskontrolle von Erkrankungen sollte Methode II Verwendung finden, da hier die Zellinkubation unter autologen Bedingungen erfolgt, d.h. daß die nicht alterierten Zellen sich im autologen Plasma unter den auch in vivo vorliegenden Bedingungen (z.B.Medikamenten- oder Vitaminkonzentrationen) befinden.
Damit sind die Ergebnisse bezüglich der Einbauaktivitäten unter dem Einfluß von Medikamenten und bei Vitamin-Mangel-Zuständen genauer.

Bei akut lyphatischen Leukämien lassen sich die Behandlungs- und Erholungsphasen unter MTX-Gabe an Hand der Einbauaktivitäten bzw. des Quotienten dUR/dTR genau verfolgen.

VII. Anhang

KA: keine Angabe für x Präparate

* : Präparat nicht auszählbar (vgl.III.-5. S.23, IV.-1.3, S.31)

KM	unbearbeitetes	isoliertes	defibriniertes
n	24 (1 KA)	24 (1*)	25
$\bar{x}$	52.5	57.3	46.8
s	25.3	24.5	27.0
v	612.9	576.4	697.6

Tab.1

% proliferierender Zellen in allen KM-Ausstrichen

KM	unbearbeitetes	isoliertes	defibriniertes
n	14 (1 KA)	15	15
$\bar{x}$	64.7	66.8	59.3
s	24.4	24.0	25.8
v	553.1	539.2	623.5

Tab. 2

% proliferierender Zellen in KM-Ausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien

KM	unbearbeitetes	isoliertes	defibriniertes
n	10	9 (1*)	10
$\bar{x}$	35.5	41.4	27.9
s	14.9	16.3	15.5
v	198.8	236.5	215.9

Tab. 3
% proliferierender Zellen in KM-Ausstrichen von Patienten mit nicht akut leukämischen Erkrankungen.

KM	unbearbeitetes	isoliertes	defibriniertes
n	15 (6 KA)	21	21
$\bar{x}$	71.8	89.1	84.3
s	21.7	14.7	14.8
v	437.8	206.0	207.7

Tab. 4
% proliferierender Zellen in Blutausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien.

KM	unbearbeitetes	isoliertes	defibriniertes
n	8 (7 KA)	15	15
$\bar{x}$	64.4	51.1	52.2
s	17.6	37.9	31.0
v	269.7	1342.9	896.0

Tab. 5
% der Blasten in KM-Ausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien.

KM	unbearbeitetes	isoliertes	defibriniertes
n	12 (9 KA)	21	21
$\bar{x}$	69.9	88.9	84.3
s	24.7	14.7	14.8
v	561.1	206.9	207.7

Tab. 6
% der Blasten in Blutausstrichen von Patienten mit akuten Leukämien.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E	Patient
dTR	20	56	20	4	alle
dUR	44	48	4	4	
dTR	20	53.3	26.7	-	akut
dUR	53.3	33.3	6.7	6.7	leuk.
dTR	20.5	50	20	10	nicht
dUR	30	70	-	-	akut leuk.

Tab. 7
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E	Patient
dTR	12.5	37.5	25	25	alle
dUR	16.7	54.2	16.7	12.5	
dTR	20	33.3	33.3	13.3	akut
dUR	33.3	46.7	6.7	13.3	leuk.
dTR	-	44.4	11.1	44.4	nicht
dUR	-	55.6	33.3	11.1	akut leuk.

Tab. 8
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E
dTR	20	13.3	33.3	33.3
dUR	20	40	6.7	33.3

Tab. 9
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil Blasten.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E	Patienten
dTR	4	24	32	40	alle
dUR	4.2	33.3	20.8	41.7	
dTR	6.7	26.7	26.7	40	akut
dUR	13.3	26.7	20	40	leuk.
dTR	-	20	40	40	nicht
dUR	-	40	20	40	akut leuk.

Tab. 10
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf alle gezählten Zellen.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E	Patienten
dTR	8	8	4	80	alle
dUR	4.2	12.5	16.7	66.7	
dTR	6.7	20	13.3	60	akut
dUR	13.3	20	20	46.7	leuk.
dTR	-	10	-	90	nicht
dUR	-	10	10	80	akut leuk.

Tab. 11

Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E
dTR	6.7	13.3	6.7	73.3
dUR	13.3	13.3	13.3	60

Tab. 12

Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil Blasten.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E	Zellen
dTR	61.9	28.6	4.8	4.8	alle
dUR	81.3	18.8	-	-	
dTR	61.9	19	14.3	4.8	prolife-
dUR	68.8	31.3	-	-	rierende
dTR	61.9	19	14.3	4.8	Blasten
dUR	68.8	31.3	-	-	

Tab. 13
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode I behandelten peripheren Blutzellen, bezogen auf alle gezählten Zellen, auf den Anteil proliferierender Zellen und den Anteil Blasten.

	<10 E	10 - 30 E	30 - 60 E	>60 E	Zellen
dTR	42.9	33.3	4.8	19	alle
dUR	57.1	33.3	4.7	4.7	
dTR	33.3	28.6	14.3	23.8	prolife-
dUR	57.1	23.8	14.2	4.7	rierende
dTR	33.3	28.6	14.3	23.8	Blasten
dUR	57.1	23.8	14.2	4.7	

Tab. 14
Prozentuale Verteilung der Einbauraten der nach der Methode II behandelten peripheren Blutzellen, bezogen auf alle gezählten Zellen, den Anteil proliferierender Zellen und den Anteil Blasten.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	25	25	alle
$\bar{x}$	23	15.2	
s	18.8	14.6	
v	337.8	205.9	
n	15	15	akute Leukämien
$\bar{x}$	19.3	15.6	
s	12.6	18.1	
v	147.4	304.5	
n	10	10	nicht akut
$\bar{x}$	28.5	14.4	leukämische
s	25.2	8	Erkrankungen
v	573.0	57.3	

Tab. 15
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	25	25	alle
$\bar{x}$	76	48	
s	73.4	36.2	
v	5178.8	1260.4	
n	15	15	akute Leukämie
$\bar{x}$	58	48	
s	41.7	36.7	
v	1626.4	1253.8	
n	10	10	nicht akut
$\bar{x}$	103.6	48.1	leukämische
s	101.6	37.6	Erkrankungen
v	9288.2	1270.3	

Tab. 16
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	21	21	akute Leukämien
$\bar{x}$	10.8	3.2	
s	16.2	4.8	
v	248.5	21.7	

Tab. 17
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode I behandelten PBL-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	21	21	akute Leukämien
$\bar{x}$	27.9	12.4	
s	36.9	18.0	
v	1294.9	308.2	

Tab. 18
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode II behandelten PBL-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	24 (1*)	24 (1*)	alle
$\bar{x}$	52.6	32.8	
s	56.2	41.6	
v	3029.8	1655.3	
n	15	15	akute Leukämien
$\bar{x}$	37	33.1	
s	34	51.3	
v	1080.5	2454.3	
n	9 (1*)	9 (1*)	nicht akut leukämische
$\bar{x}$	78.5	32.4	Erkrankungen
s	76.5	19.1	
v	5203.0	323.3	

Tab. 19
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	25	25	alle
$\bar{x}$	272	154.9	
s	471.8	160.6	
v	213727.4	24754.0	
n	15	15	akute Leukämien
$\bar{x}$	120.3	113.5	
s	95.3	114.0	
v	8484.7	12132.7	
n	10	10	nicht akut
$\bar{x}$	499.5	216.9	leukämische
s	695.5	203.5	Erkrankungen
v	435331.1	37271.5	

Tab. 20
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	21	21	akute Leukämien
$\bar{x}$	13.2	5	
s	18.3	7.3	
v	325.3	51.1	

Tab. 21
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode I behandelten PBL-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	21	21	akute Leukämien
$\bar{x}$	35.9	16.9	
s	49.0	25.4	
v	2290.7	614.1	

Tab. 22
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode II behandelten PBL-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	15.0 (13)	15.0 (13)	akute Leukämien
$\bar{x}$	346.1 (76.3)	338.1 (51.2)	
s	720.0 (107.5)	926.6 (87.3)	
v	483845.1 (10670.8)	801292.9 (7040,6)	

Tab. 23
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil Blasten. In Klammern: Ergebnisse ohne Extremwerte.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	15.0 (13)	15.0 (13)	akute Leukämien
$\bar{x}$	194.3 (146.6)	227.8 (113.4)	
s	193.5 (146.7)	340.1 (143.6)	
v	34962.9 (19877.9)	107983.3 (19033.3)	

Tab. 24
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil Blasten. In Klammern: Ergebnisse ohne Extremwerte.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	21	21	akute Leukämien
$\bar{x}$	13.2	5	
s	18.5	7.3	
v	325.3	51.1	

Tab. 25
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode I behandelten PBL-Zellen, bezogen auf den Anteil Blasten.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	21	21	akute Leukämien
$\bar{x}$	35.9	16.9	
s	49.0	25.4	
v	2290.7	614.1	

Tab. 26
Einbauaktivitäten von dTR und dUR der nach der Methode II behandelten PBL-Zellen, bezogen auf den Anteil Blasten.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	22	22	alle ohne
$\bar{x}$	22.7 (23)	14.4 (15.2)	Fall I - III
s	19.7	15.4	
v	372	227.1	
n	7	7	nicht akut leukämische
$\bar{x}$	29.9 (28.5)	13.1 (14.5)	Erkrankungen
s	30.1	8.1	ohne Fall I - III
v	776.8	55.9	

Tab. 27
Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Bei beiden Patientengruppen sind die Fälle I - III ausgenommen. In Klammern:Werte mit Fall I - III.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	22	22	alle ohne
$\bar{x}$	53 (52.6)	33.2 (32.8)	Falle I - III
s	58.5	43.4	
v	3270.9	1797.2	
n	7	7	nicht akut leukämische
$\bar{x}$	87.3 (78.5)	33.5 (32.4)	Erkrankungen
s	85.3	21.3	ohne Fall I - III
v	6239.3	389	

Tab. 28
Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode I behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen. Bei beiden Patientengruppen sind die Fälle I - III aus - genommen. In Klammern: Werte mit Fall I - III.

	dTR	dUR	Patientengruppe
	22	22	alle
$\bar{x}$	55.7 (76)	41.9 (48)	ohne Fall I - III
s	39.2	33.4	
v	1465.9	1066.3	
n	7	7	nicht akut
$\bar{x}$	50.8(103.6)	28.9 (48.1)	leukämische Erkran-
s	35.6	22	kungen ohne Fall I - III
v	1086.7	415.8	

Tab. 29
Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Bei beiden Patientengruppen sind die Fälle I - III ausgenommen.
In Klammern: Werte mit Fall I - III.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	22	22	alle
$\bar{x}$	131.2(272)	108.8 (154.9)	ohne Falle I - III
s	91.3	102.9	
v	7952.8	10109.0	
n	7	7	nicht akut
$\bar{x}$	154.4(499.5)	98.7 (216.9)	leukämische Erkan-
s	83.3	81	kungen ohne Fall I - III
v	6024.7	5623.8	

Tab. 30
Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen. Bei beiden Patientengruppen sind die Fälle I - III ausgenommen. In Klammern: Werte mit Fall I - III.

	dTR	dUR	Patientengruppe
n	25	25	alle
$\bar{x}$	196.6 (272)	129.3 (154.9)	
s	219.8	115	
v	46384	12701.1	
n	10	10	nicht akut leukämische
$\bar{x}$	308.2 (499.5)	153 (216.9)	Erkrankungen
s	300.7	118.4	
v	81355.5	12615	

Tab. 31
Einbauaktivitäten von dTR und dUR in die nach der Methode II behandelten KM-Zellen, bezogen auf den Anteil proliferierender Zellen. Bei beiden Gruppen fand bezüglich der Fälle I - III eine erneute Differenzierung der entsprechenden Zellausstriche statt.
In Klammern: Werte vor erneuter Differenzierung.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Begemann H.
Praktische Hämatologie, 2.Aufl.
G.-Thieme-Verlag, Stuttgart-New York 1977

2. Beyersmann D.
Nucleinsäuren, Chemische Taschenbücher
Herausgeber: Foerst W., Grünewald H.,
Verlag Chemie, Weinheim-New York 1971

3. Bolland H., Pfisterer H., Ruppelt W., Michlmayr G.
Verkürzung der Lebensdauer DF^{32}-P-markierter Granulozyten nach Isolierung mit Dextran oder Ammoniumchlorid
Blut 22 (1971), 60 - 66

4. Fischer - Homberger E.
Geschichte der Medizin, 2.Aufl.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977

5. Frick P.
Blut- und Knochenmarksmorphologie, Blutgerinnung
15.Aufl.
Thieme-Verlag, Stuttgart-New York 1980

6. Kaudewitz F.
Molekular- und Mikrobengenetik
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1973

7. Lehninger A.L.
Biochemie, 2.Aufl.
Verlag Chemie, Weinheim-New York 1977

8. Radiologisches Zentrum der Universität Heidelberg
Kursus Radiologie und Strahlenschutz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1972

9. Romeis B.
Mikroskopische Technik, 15.Aufl.
Luhni Verlag, München 1948

10. Sauer H., Jaenicke L.
Zur Aufhebung des zytostatischen Effekts von Amethopterin (Methotrexat) durch Methyltetrahydrofolsäure
Blut 28 (1974), 321 - 327

11. Sauer H., Schalhorn A.
Rationale Grundlagen und Praxis des Citroforumfaktor (Leucovorin) - Schutzes nach hochdosierter Methotrexattherapie
Onkologie 3 (1980), 64 - 71

12. Sauer H., Schalhorn A., Wilmanns W.
Zum biochemischen Mechanismus des Citroforumfaktorschutzes nach hochdosierter Methotrexatbehandlung maligner Tumoren
Therapiewoche 28 (1978), 7809 - 7814

13. Sauer H., Schalhorn A., Wilmanns W.
The Biochemistry of the Citroforum Factor Rescue Effect in Normal Bone Marrow Cells after High-Dose Methotrexate
Europ.J.Cancer 15 (1979), 1203 - 1209

14. Sauer H., Pelka R., Wilmanns W.
Zur Pharmakokinetik von Hydroxy-Harnstoff und seine Anwendung bei der Therapie von akuten myeloischen Leukämien unter Ausnutzung von Synchronosation und Recruitment-Effekten
Klin.Wschr.54 (1976), 203 - 209

15. Sauer H., Wilms K., Wilmanns W., Jaenicke L.
Die Aktivität der Methioninsynthetase (5-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure: Homocystein Methyltransferase) als Proliferationsparameter in wachsenden Zellen
Acta Hämatologica 49 (1973), 200 - 210

16. Sauer H., Wilmanns W.
Derzeitiger Stand der Synchronisationstherapie von malignen Tumoren und akuten Leukämien
Klin.Wschr. 54 (1976), 197 - 202

17. Sauer H., Wilmanns W.
Cobalmin-Dependend Methionine Synthesis and Methyl-Folate-Trap in Human Vitam B_{12} Deficiency
British Journal of Haematology 36 (1977), 189 - 198

18. Wilmanns W.
Die Thymidinkinase in normalen und leukämischen Zellen
Klin.Wschr. 45 (1967), 505 - 511

19. Wilmanns W.
Bestimmung, Eigenschaften und Bedeutung der Dihydrofolsäure-Reduktase in den weißen Blutzellen bei Leukämien
Klin.Wschr. 40 (1962), 533 - 540

20. Wilmanns W., Kehr D.
DNS-Synthese in Leukämiezellen unter der Einwirkung von Methotrexat, 5-Fluoruracil und Cytosin-Arabinosid in vitro
Pharmacologica Clinica 2 (1970), 161 - 166

21. Wilmanns W., Neef V.
Die Thymidylat-Synthetase in weißen Blutzellen und Knochenmark unter normalen und pathologischen Bedingungen
Klin.Wschr. 49 (1971), 755 - 762

22. Wendt F.
Kleines Vademecum Haematologicum Nordmark
Nordmark-Werke GmbH, Hamburg 1979

IX. Lebenslauf

Am 10. Mai 1956 wurde ich, Ursula Vehling, als älteres von zwei Kindern des Gärtnermeisters, Theodor Vehling, und seiner Ehefrau Ilse, geb. Scholz, in Recklinghausen geboren. Meine Mutter starb 1977 an den Folgen eines Melanoms.

1963 wurde ich in die Grundschule Datteln eingeschult und wechselte nach dem 5.Schuljahr zum Gymnasium Datteln über, wo ich den naturwissenschaftlichen Zweig besuchte. 1976 legte ich mein Abitur ab und begann an der Ruhr - Universität Bochum mit dem Studium der Fächer Mathematik, Biologie und Pädagogik. Nach drei Semestern bestand ich meine Zwischenprüfung in Mathematik und Pädagogik und begann im folgenden Semester mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität München. Das Physikum bestand ich 1979, das erste Staatsexamen 1980. 1981 wurde ich in die Studienstiftung des Deutschen Volkes aufgenommen. Das zweite Staatsexamen legte ich 1982, das dritte Staatsexamen 1983 ab.